

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
FACULTAD DEL DEPORTE
DEPARTAMENTO DE DEPORTE E INFORMÁTICA
DOCTORADO EN ALTO RENDIMIENTO DEPORTIVO



EFFECTO DEL EJERCICIO EXTENUANTE SOBRE EL METABOLISMO DE LA
GLUTAMINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO E HÍGADO DE RATONES BALAB/c
DE 12 MESES.

PRESENTA

ALICIA SANTILLÁN MARTÍNEZ

SEVILLA, ESPAÑA, 2 de Febrero de 2016

UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE-UPO

**DEPARTAMENTO DE DEPORTE E INFORMÁTICA
DOCTORADO EN ALTO RENDIMIENTO DEPORTIVO**

EFFECTO DEL EJERCICIO EXTENUANTE SOBRE EL METABOLISMO DE LA GLUTAMINA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO E HÍGADO DE RATONES BALAB/c DE 12 MESES.

Trabajo de investigación realizado por
Alicia Santillán Martínez
para optar al Título de
Doctora en Alto Rendimiento Deportivo

Bajo la dirección de:

Prof. Dr. Edgar Abarca Rojano

Prof. Dr. Eleazar Lara Padilla



Tutor: Prof. Dr. Francisco José Berral de la Rosa

AGRADECIMIENTO

Gracias a todos los que confiaron en mí, me alentaron y creyeron en esta investigación.

Gracias a los que colaboraron e hicieron de esta tesis una realidad.

Agradezco a mi familia por su gran apoyo, comprensión y confianza.

Los amo, Gracias

Agradezco el apoyo y la confianza recibida por mis mentores, los Doctores:

Eleazar Lara Padilla

Rafael Campos Rodríguez

Edgar Abarca Rojano

Humberto Reyna Garfias

Por apoyarme a completar este proyecto y compartir sus conocimientos.

Gracias al Maestro José Abel Fuentes Toledo por su apoyo en la búsqueda literaria y sus comentarios siempre muy acertados.

GRACIAS DIOS POR TRAERME A ESTE MOMENTO CON SALUD Y RODEADA DE AMOR

INDICE GENERAL

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	7
INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE GRÁFICOS	11
INDICE DE ANEXOS	12

RESÚMEN	13
ABSTRACT	14
I. INTRODUCCIÓN	15
I.1 Generalidades	16
I.1.1 Tipos de fibra muscular esquelética	18
I.1.1.1 Fibras rojas	19
I.1.1.2 Fibras blancas	20
I.1.1.3 Fibras intermedias	20
I.1.2 Tipos de ejercicio	22
I.1.2.1 Ejercicio aeróbico	22
I.1.2.2 Ejercicio anaeróbico	23
I.1.3 Adaptación del músculo esquelético al ejercicio	24
I.1.4 Adaptaciones orgánicas al ejercicio	25
I.1.4.1 Adaptaciones metabólicas	25
I.1.4.2 Adaptaciones Circulatorias	27
I.1.4.3 Adaptaciones Cardiacas	28
I.1.4.4 Adaptaciones Respiratorias	28
I.1.4.5 Adaptaciones Sanguíneas	28
I.2 Fisiología del ejercicio	30
I.2.1 Adaptaciones hormonales	30
I.2.2 Cortisol	31
I.2.3 Energía durante el ejercicio	33
I.2.4 Glutamina	36
I.2.5 Myc oncogen	39

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	44
III. OBJETIVO E HIPÓTESIS	45
IV. JUSTIFICACIÓN	47
V. MATERIALES Y MÉTODOS	49
V.1 Tipo de estudio	49
V.2 Conformación de los grupos. Criterios de selección	50
V.3 Conformación de los grupos para las intervenciones	51
V.4 Intervenciones	55
V.5 Tratamientos	56
V.6 Obtención de muestras biológicas	58
V.7 Aislamiento de RNA total	60
V.8 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Q-RT PCR)	64
V.9 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	68
V.10 Captura y procesamiento estadístico	72
V.10.1 Análisis estadístico	72
VI. RESULTADOS	75
VII. DISCUSIÓN	90
VIII. CONCLUSIONES	95
IX. BIBLIOGRAFÍA	97
X. ANEXOS	109

LISTA DE ABREVIATURAS

Glutamina	Gln
Glutamato	Gto
Alfa-cetoglutamato	α-KG
Glutamina sintetasa	Gls
Glutamato deshidrogenasa 1	Glud 1
Glutamina sintasa	Gs
Ciclo del ácido tricarboxílico	ATC
Intermediario(s) del ciclo del ácido tricarboxílico	iATC
Sedentario	SED
Ejercicio moderado	EM
Sedentario con sesión prolongando de nado	SED/SPN
Ejercicio moderado con sesión prolongada de nado	EM/SPN
Sesión prolongada de nado	SPN
Oncogen mielocitomatosis	Myc
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	ELISA
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	Q-RT PCR
Microlitro	μL
Di-etil pirocarbonato	DEPC
Deoxiribonucleasa genética	DNasas
Cebadores específicos	dNTPs
Hormona adrenocorticotrópica	ACTH
Actividad Total	AT

INDICE DE TABLAS

		Páginas
Tabla 1	Principales características de las fibras musculares.	22
Tabla 2	Adaptación hormonal al ejercicio	32
Tabla 3	Porcentaje de consumo energético en el ejercicio	36
Tabla 4	Criterios de selección	50
Tabla 5	Descripción general de los cuatro grupos y sus diferentes intervenciones	53
Tabla 6	Peso de los ratones	54
Tabla 7	Indicadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT).	65
Tabla 8	Media y desviación estándar de peso de ratones	75
Tabla 9	Media y desviación estándar del gen Glis en músculo esquelético e hígado.	80
Tabla 10	Media y desviación estándar del gen Glud 1 en músculo esquelético e hígado.	81
Tabla 11	Media y desviación estándar del gen Gs en músculo esquelético e hígado.	82
Tabla 12	Media y desviación estándar del gen Myc en músculo esquelético e hígado.	84
Tabla 13	Tabla para cálculo de resultados de Corticosterona	86
Tabla 14	Resultados para trazar la curva estándar de Corticosterona	86
Tabla 15	Media y desviación estándar de Corticosterona plasmática	88

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1 A, B, C	Imágenes de fibras musculares estriadas esqueléticas mostrando la presencia de células satélite mediante técnicas inmunofluorescentes.	17
Figura 2	Imagen de fibra muscular esquelética. Fotomicrografía electrónica de secciones longitudinales de dos fibras musculares estriadas esqueléticas. Se observa la presencia de un núcleo periférico y abundantes miofibrillas constituidas por una sucesión de sarcómeros limitadas por las líneas Z mostrando las bandas claras y oscuras.	18
Figura 3	Imagen de los diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas del músculo gastronecnio de cobayo.	21
Figura 4	Fotomicrografía mostrando los tres tipos de fibras musculares. Reacción histoquímica de succinodehidrogenasa.	21
Figura 5	Interacción del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal con el eje hipotálamo-hipófisiario-gonadal. Las líneas punteadas representan represión mientras que las continuas representan estimulación.	31
Figura 6	Síntesis de ATP muscular. Sistema de producción de ATP en el músculo esquelético.	34
Figura 7	Vía de la glutaminólisis.	38
Figura 8	Vías de la glutaminólisis para generar NADPH.	42
Figura 9 A, B, C	Ratones seleccionados aleatoriamente en grupos. Ratones machos BALB/c colocados individualmente en jaulas.	52
Figura 10	Ratones nadando. Los ratones se colocan en piscinas de plástico transparente individuales para nadar. Diseño experimental	55
Figura 11	Diseño experimental. Se muestran las semanas de vida de los ratones al inicio de cada una de las intervenciones, hasta su sacrificio.	58
Figura 12 A, B	Obtención de muestras biológicas. Obtención de muestra de A) Músculo esquelético, B) Hígado.	59

Figura 13	Muestra con Trizol A las muestras se les agregó Trizol para homogenizar las muestras de músculo esquelético e hígado.	60
Figura 14	Separación de fases. Obtención del RNA, donde solo se obtiene la fase acuosa.	61
Figura 15	Secuencia de PCR. Determinación de corticosterona plasmática por el método de ELISA.	68
Figura 16	Estructura de la corticosterona.	70
Figura 17	Electroforesis de RNA's en Gel de agarosa al 0.5%. La figura muestra integridad de RNA's, ribosómicos, (18s y 28s). En los carriles L1-L3 hay muestras de musculo esquelético de ratones control y en los carriles L4-L7 hay muestras de hígado de ratones control.	77
Figura 18	Curvas de rango dinámicas de PCR en tiempo real.	78
Figura 19	Amplicones en gel de agarosa. En la figura se aprecia en el carril número 1, el marcador de peso molecular que oscilaba entre 100-1500 pdb y se repite también en los carriles 8, 12, 17, el carril 2, 3 esta MYC, carril 6, 7 Gls, carril 10, 11 Glud1, en los carriles 14 y 15 Glul.	79

INDICE DE GRÁFICOS

		Páginas
Gráfico 1	Peso de los ratones.	76
Gráfico 2	Expresión relativa del ARNm de Glis: En ratones sedentarios (SED), con ejercicio moderado (EM), con y sin sesión de nado extenuante. Los valores representan la media \pm desviación estándar del grupo de 6 ratones, considerando que *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ comparado con el grupo sedentario de los tejidos respectivos. Expresión relativa del ARNm de Glis	80
Gráfico 3	Expresión relativa del ARNm de Glud 1 en ratones sedentarios (SED), con ejercicio moderado (EM), con y sin sesión de nado extenuante. Los valores representan la media \pm desviación estándar del grupo de 6 ratones, considerando que *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ comparado con el grupo sedentario de los tejidos respectivos.	81
Gráfico 4	Expresión relativa del ARNm de Gs: en ratones sedentarios (SED), con ejercicio moderado (EM), con y sin sesión de nado extenuante. Los valores representan la media \pm desviación estándar del grupo de 6 ratones, considerando que *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ comparado con el grupo sedentario de los tejidos respectivos.	83
Gráfico 5	Expresión relativa del ARNm de Myc en ratones sedentarios (SED), con ejercicio moderado (EM), con y sin sesión de nado extenuante. Los valores representan la media \pm desviación estándar del grupo de 6 ratones, considerando que *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ comparado con el grupo sedentario de los tejidos respectivos.	84
Gráfico 6	Curva estándar de albumina. La curva consistió en 7 diluciones diferentes de albumina con una correlación de 0.996.	85
Gráfico 7	Curva estándar de corticosterona.	87
Gráfico 8	Niveles plasmáticos de Corticosterona	88

INDICE DE ANEXOS

		Página
ANEXO 1	Dieta Harlen NIH-31	110
	ÍNDICES DE CALIDAD	111
ANEXO 2	Cartel presentado en el 1er Congreso Internacional en Ciencias del Deporte 2012	111
ANEXO 3	Diploma del 2do Congreso Internacional en Ciencias del Deporte 2013	112
ANEXO 4	Cartel presentado en el 2do Congreso Internacional en Ciencias del Deporte 2013	113
ANEXO 5	Cartel presentado en el VIII del Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica	114
ANEXO 6	Diploma obtenido por la presentación del Cartel en Mazatlán 2014	115
ANEXO 7	Constancia de envío del Manuscrito a la revista BIOLOGY OF SPORT	116
ANEXO 8	Revista BIOLOGY OF SPORT, jcr	117
ANEXO 9	Manuscrito enviado a la revista BIOLOGY OF SPORT	118

RESUMEN

El tejido muscular es el sitio principal de la síntesis de glutamina, es el más abundante aminoácido libre en circulación. La glutaminólisis en las células musculares aumenta con la sobreexpresión del oncogén de mielocitomatosis (Myc). Mientras que el ejercicio intenso disminuye los niveles de glutamina en plasma, el entrenamiento moderado de ejercicio mantiene los niveles normales, posiblemente por los cambios adaptativos en diversos tejidos como el hígado, importante en el mantenimiento de la homeostasis. Para evaluar los efectos de una sesión de nado largo (5.5 h) con y sin la práctica previa de ejercicio moderado, en el metabolismo de la glutamina del músculo esquelético e hígado, ratones macho BALB/c fueron divididos en cuatro grupos: sedentarios (SED), sedentarios con una sesión final de natación extenuante (SED/NE), la práctica de ejercicio moderado (ME), y la práctica de ejercicio moderado con una sesión final de natación extenuante (ME/SE). Los niveles de corticosterona plasmática se midieron por ELISA. Con PCR en tiempo real, la expresión génica se determinó para Myc, la glutamina sintetasa (GS), glutaminasa 1 (GLS) y glutamato deshidrogenasa 1 (Glud-1) en el músculo esquelético y el tejido hepático. Al comparar SED/NE y ME/NE con sus respectivos controles, un aumento significativo en los niveles de corticosterona se asoció con una mayor expresión Gs mRNA; la expresión del transcrito también aumentó para Myc en el grupo SED/NE y para GLS y Glud-1 en el grupo de ME/NE. La práctica de ejercicio moderado a largo plazo puede adaptar el organismo a responder mejor a la actividad vigorosa por: 1) la promoción de la expresión de genes de enzimas que aumentan intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico, 2) los niveles de moderación de la respuesta de corticosterona, y 3) la disminución de expresión del gén Myc en el músculo esquelético.

ABSTRACT

Muscle tissue is the main site of synthesis for glutamine, the most abundant free amino acid in circulation. Glutaminolysis in muscle cells increases with the overexpression of the myelocytomatosis oncogene (Myc). Whereas intense exercise decreases plasma glutamine levels, moderate exercise training maintains normal levels, possibly by adaptive changes in various tissues including the liver, important in maintaining homeostasis. To evaluate the effects a long swim session (5.5 h) with and without previous moderate exercise training, on the glutamine metabolism skeletal muscle and liver. Male BALB/c mice were divided into four groups: sedentary (SED), sedentary with a final bout of strenuous swimming (SED/SSW), moderate exercise training (ME), and moderate exercise training with a final bout of strenuous swimming (ME/SSW). Plasmatic corticosterone levels were measured by ELISA. With real-time PCR, gene expression was determined for Myc, glutamine synthetase (Gs), glutaminase 1 (Gls), and glutamate dehydrogenase 1 (Glud-1) in skeletal muscle and liver tissue. When comparing SED/SSW and ME/SSW with their respective controls, a significant increase in corticosterone levels was associated with greater Gs mRNA expression, transcript expression also increased for Myc in the SED/SSW group and for Glis and Glud-1 in the ME/SSW group. Long-term moderate exercise training may adapt the organism to better respond to strenuous activity by: 1) promoting the expression of genes of enzymes that increase intermediates of the tricarboxylic acid cycle, 2) moderating levels of the corticosterone response, and 3) decreasing Myc gene expression in skeletal muscle.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Generalidades

El músculo esquelético representa entre el 40%-50% del peso corporal, es responsable de la postura y de los movimientos del esqueleto transformando energía química en mecánica. Las fibras musculares o miocitos que están especialmente diferenciados reciben el nombre de *fibras musculares* debido a su forma alargada. Cada fibra muscular está rodeada por una red de fibras reticulares (*endomisio*). Se encuentran agrupadas en paquetes entre los que encontramos estructuras de tejido conjuntivo (*perimisio*), (fibras colágenas elásticas), vasos y nervios. Todo el músculo está recubierto por una vaina de tejido conjuntivo (*epimisio*), que se continúa con el tejido conjuntivo que rodea a los paquetes de fibras y a los tendones ⁽¹⁾.

La fibra muscular esquelética es una célula cilíndrica, alargada, polinucleada, cuyos núcleos (pueden ser varios cientos) se encuentran situados inmediatamente por debajo de la membrana de la célula. Son las células más largas de nuestro organismo, por la fusión de muchas células musculares embrionarias individuales, pueden medir varios milímetros o varios centímetros de longitud, y entre 50 a 80 micrómetros de diámetro ⁽²⁾. Los núcleos los encontramos a intervalos a lo largo de la célula, y presentan posiblemente alguna forma de comunicación internuclear que garantiza que las propiedades celulares sean compatibles a lo largo de toda la célula. Sin embargo cada núcleo guarda también un determinado grado de autonomía, hecho que se confirma a un estudio como la electroestimulación. Las células satélite (CS) son esenciales para el crecimiento del músculo esquelético y reparación ⁽³⁾. Las células satélite (CS), o "células madre musculares," son la única fuente para la generación de nuevos mionúcleos in vivo en el tejido muscular esquelético ⁽⁴⁾. Como

tal, la CS parece ser esencial para la reparación y la hipertrofia del tejido muscular esquelético. Normalmente, las CS se encuentran en reposo entre la lámina basal y la membrana plasmática de las fibras musculares. En la activación y proliferación posterior, la mayoría de estas CS se diferencian para formar nuevos mionúcleos que o bien se funden con las fibras existentes o generan nuevas fibras, mientras que una pequeña proporción vuelve a la quiescencia ⁽⁵⁾. En la etapa adulta conservan su capacidad de proliferación y diferenciación celular. Ante la lesión o ruptura leve de una fibra muscular esquelética, proliferan y fusionan sus membranas celulares con el sarcolema de la fibra lesionada, reparando en parte la lesión ⁽²⁾. (Figuras 1 A, B, C)

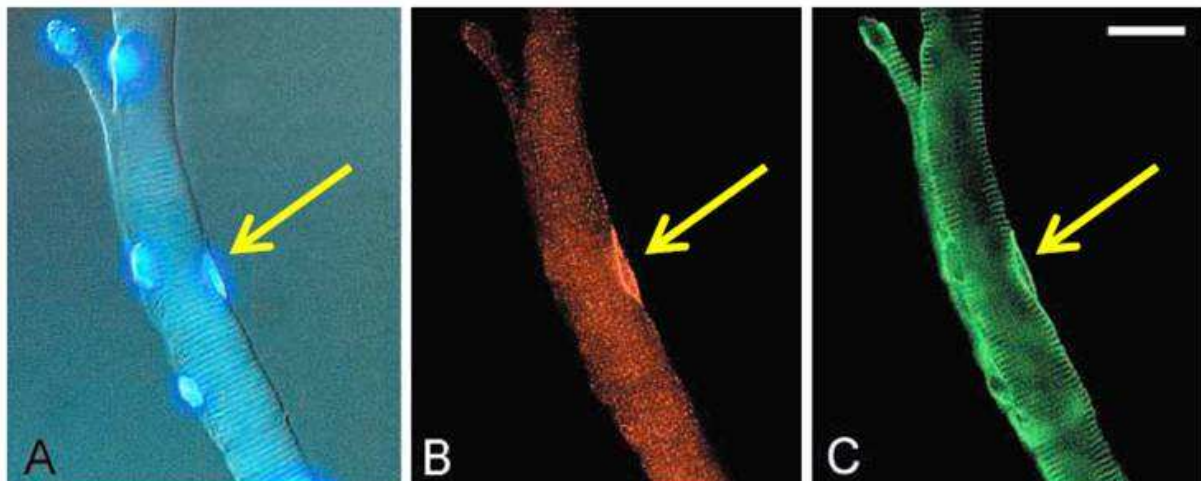


Figura 1 A, B, C. Imágenes de fibras musculares estriadas esqueléticas mostrando la presencia de células satélite mediante técnicas inmunofluorescentes.

A la membrana celular se le denomina *sarcolema*, mientras que el citoplasma de las células musculares se denomina *sarcoplasma*. Las fibras musculares contienen escaso citosol, y la gran mayoría del citoplasma está ocupado por unas estructuras complejas denominadas *miofibrillas*. Las miofibrillas son haces de proteínas elásticas y contráctiles que llevan a cabo la función de la contracción ⁽¹⁾.

Las fibras musculares contienen un extenso *retículo sarcoplásmico*, el cual se dispone de forma especial alrededor de las miofibrillas. La función de dicha estructura es concentrar y secuestrar iones de calcio. En íntima asociación con el retículo sarcoplásmico, encontramos los *túbulos T* o túbulos transversos. Estas estructuras son invaginaciones del sarcolema que penetran hacia el interior de la fibra perpendicularmente a la superficie, de modo que la membrana de los túbulos T es el propio sarcolema, y en su interior encontramos líquido extracelular ⁽²⁾ (Figura 2).

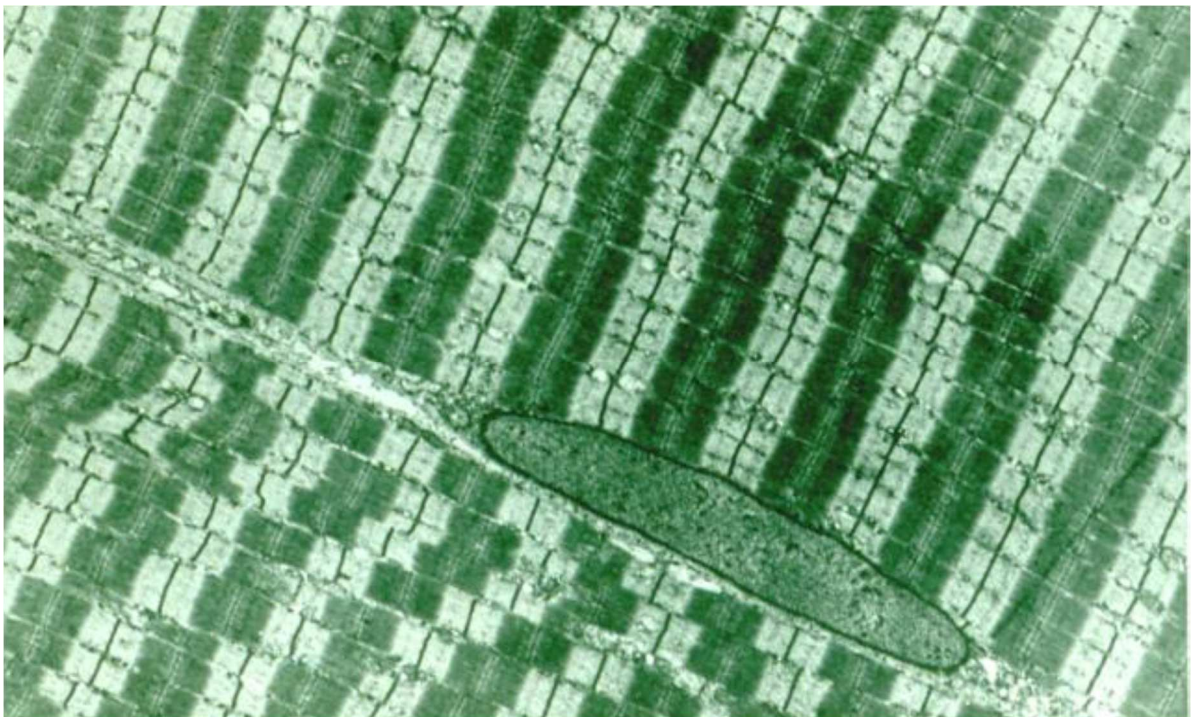


Figura 2. Imagen de fibra muscular esquelética. Fotomicrografía electrónica de secciones longitudinales de dos fibras musculares estriadas esqueléticas. Se observa la presencia de un núcleo periférico y abundantes miofibrillas constituidas por una sucesión de sarcómeros limitadas por las líneas Z mostrando las bandas claras y oscuras.

I.1.1 Tipos de fibra muscular esquelética

Las fibras musculares o miofibras que forman un músculo no presentan las mismas características, sino que muestran variabilidad en sus propiedades

citoquímicas y fisiológicas. Además, las proporciones relativas de los diferentes tipos de fibras también varían en cada músculo. Por su fisiología se distinguen dos tipos de fibras musculares: **fibras clónicas** (fibras de contracción rápida) que propagan un potencial de acción y responden con una contracción del tipo “todo o nada”, y **fibras tónicas** (fibras de contracción lenta) que son incapaces de propagar un potencial de acción y que requieren una serie de impulsos nerviosos. La contracción de estas últimas es más prolongada que la de las fibras clónicas ^(6,7).

Los métodos citoquímicos de tinción permiten distinguir con facilidad tres tipos de fibras que se han denominado tradicionalmente *fibras rojas*, *fibras blancas* y *fibras intermedias*.

I.1.1.1 Fibras rojas

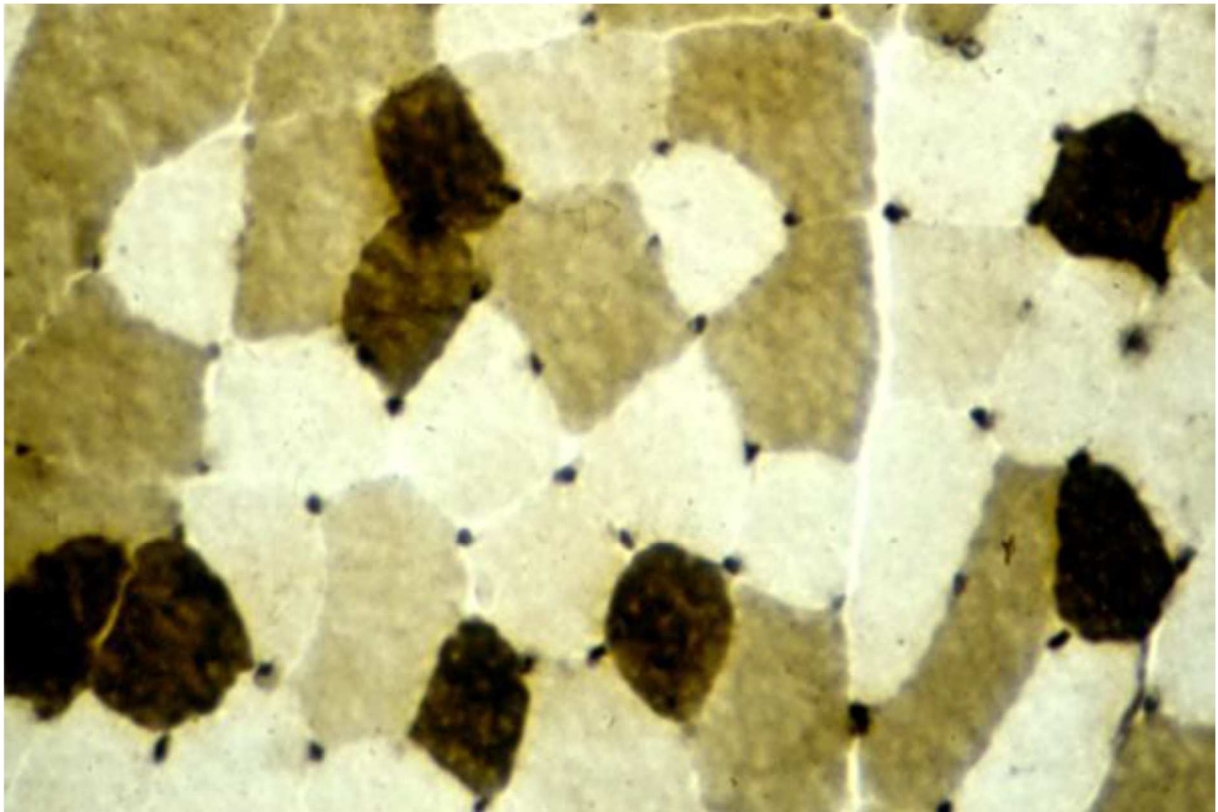
Fibras oxidativas y de contracción lenta, tienen un diámetro relativamente pequeño y un color oscuro, atribuible a su mayor contenido de mioglobina y a su mayor irrigación capilar. Presentan numerosas mitocondrias de gran tamaño bajo el sarcolema y entre las miofibrillas. En el sarcoplasma es frecuente observar pequeñas gotas de lípidos. Las bandas Z suelen ser más anchas que las de otros tipos de fibras. Suelen estar inervadas por pequeños axones y poseen placas motoras relativamente simples y de tamaño pequeño. Las unidades motoras se contraen más lentamente, y son muy resistentes a la fatiga debido a su capacidad para regeneración oxidativa del ATP. Histológicamente se clasifican como *Tipo I: Fibras rojas, de contracción lenta*, realizan metabolismo aeróbico. Estas propiedades hacen que las fibras rojas sean especialmente eficaces en el mantenimiento de la postura. Estas fibras rojas se encuentran en los músculos de las extremidades, en los largos de la espalda ^(8,9).

I.1.1.2 Fibras blancas

Fibras de contracción rápida y fugaz, son las de mayor tamaño. Con mitocondrias más pequeñas y escasas que las de las fibras rojas, y casi no existen en las zonas intermiofibrilares. La producción de ATP depende de la glucólisis anaerobia de la glucosa procedente de los abundantes depósitos de glucógeno que poseen en su sarcoplasma. Estas fibras están innervadas por axones de mayor calibre que dan lugar a placas motoras de tamaño doble a las que presentan las fibras rojas. Se contraen rápidamente y generan una fuerza importante, aunque se fatigan también con rapidez, por lo que son más adecuadas para los momentos breves de actividad muscular intensa. Histológicamente se les clasifica como fibras Tipo IIb: Fibras blancas, de contracción rápida, realizan metabolismo anaeróbicos, son el suministro principal de energía ^(8,9).

I.1.1.3 Fibras intermedias

Son una combinación entre las fibras rápidas y lentas, contienen poca mioglobina y son relativamente claras. Tienen una red capilar más amplia a su alrededor, sin embargo, son más resistentes a la fatiga que las fibras rápidas. Son también conocidas como fibras de contracción de rápida oxidación. Histológicamente se les clasifica como fibras Tipo IIa: Fibras de contractilidad intermedia, realizan tanto procesos aeróbicos como anaeróbicos, son activos ^(8,9) (Figuras 3 y 4. Tabla 1)



Figuras 3. Imagen de los diferentes tipos de fibras musculares esqueléticas del músculo gastronecnio de cobayo.

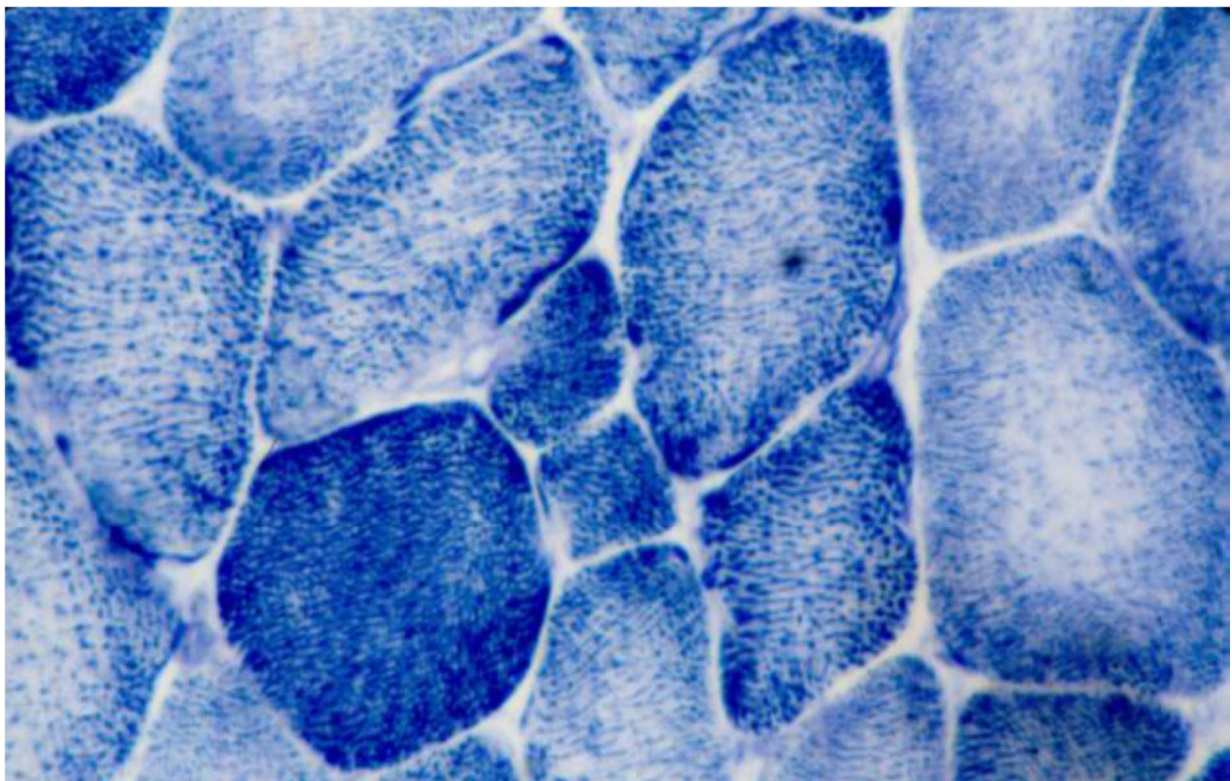


Figura 4. Fotomicrografía mostrando los tres tipos de fibras musculares. Reacción histoquímica de succinodihidrogenasa

Tabla 1. Principales características de las fibras musculares.

	Fibras tipo I	Fibras tipo IIa	Fibras tipo IIb
Metabolismo	Aeróbico	Glicolítico-oxidativo	Anaeróbico
Motoneuronas	α -2 (calibre pequeño)	Medio	α -1 (calibre grueso)
Unidades motoras (umbral de excitabilidad)	Lentas con bajo umbral	Intermedias con umbral medio	Rápidas con alto umbral
Resistencia a fatiga	Alta	Media	Baja
Irrigación	Abundante	Intermedio	Escaso
Gránulos de glucógeno	Raros	Frecuentes	Numerosos
No. de mitocondrias	Grande	Medio	Pequeño
Cantidad de mioglobina	Alta	Media	Baja
Color	Roja	intermedia	Blanca
Fuerza de contracción	Poco potente	Potencia media	Muy potente
Velocidad de contracción	Lenta	Intermedia	Rápida
Tiempo de contracción	Largo	Medio	Corto
Tipo de ejercicio característico	Larga duración con intensidad baja a moderada. Ejercicio: corridas largas, caminata, ciclismo, gimnasia.	Duración media e intensidad intermedia. Ejercicio: muscular, natación.	Corta duración e intensidad alta. Ejercicio: corridas corta, saltos, levantamiento de pesas.

I.1.2 Tipos de ejercicio

I.1.2.1 Ejercicio aeróbico

Son ejercicios de media o baja intensidad y de larga duración, donde el organismo necesita quemar hidratos de carbono y grasas para obtener energía, para lo que necesita oxígeno. Requiere predominantemente un *trabajo muscular dinámico*.

Se movilizan grandes grupos musculares, se contraen de forma rítmica, dando lugar al movimiento. Se producen cambios en la longitud de la fibra del músculo y poco aumento de la tensión. Como ejercicios de predominio dinámico se menciona caminar, correr, nadar o andar en bicicleta. El ejercicio aeróbico permite grandes beneficios para la salud por su entrenamiento dinámico, implica una intensidad moderada-vigorosa que mejora la forma y capacidad física en cualquier persona. Se producen una serie de adaptaciones a diferentes niveles del organismo: cardiovascular, respiratorio, muscular, metabólico, óseo; por lo que se considera el tipo de ejercicio más recomendable para mejorar la salud. Entre las adaptaciones podemos destacar: un aumento del gasto cardíaco, de la ventilación pulmonar y del consumo máximo de oxígeno, junto con una mejoría en la extracción y utilización del oxígeno por las fibras musculares. Además, contribuye en el control de los factores de riesgo cardiovascular, al disminuir las cifras de presión arterial, los niveles de colesterol y de glucosa en sangre y tiene efecto antitrombótico. Ayuda también a perder peso y mantenerlo. Todos estos efectos ayudan a mantener la salud y prevenir enfermedades cardiovasculares ^(10,11).

I.1.2.2 Ejercicio anaeróbico

Son ejercicios de alta intensidad y poca duración. No requiere oxígeno porque la energía proviene de fuentes inmediatas que no necesitan ser oxidadas por el oxígeno, como son el ATP muscular, la fosfocreatina y la glucosa. Su trabajo muscular es estático, de fuerza, con cambios en la tensión muscular. Se clasifican dos tipos de ejercicio: I) *Isométrico*: produce una contracción muscular sostenida, con una resistencia fija que no se puede vencer (ejemplo, empujar una pared); II) *isotónico*, produce una contracción muscular contra una resistencia que puede vencer (ejemplo, movilizar pesas de pocos kilogramos). Este ejercicio de fuerza y potencia muscular se

incrementa mediante la movilización de cargas pesadas con pocas repeticiones. Mejora la resistencia, flexibilidad y elasticidad, se consigue movilizand o cargas ligeras con mayor número de repeticiones. Estas adaptaciones son benéficas para mejorar las cualidades físicas que se están entrenando, así mismo mejoran el metabolismo basal, disminuye el porcentaje de grasa, y actúa positivamente en el control de algunos factores de riesgo, pero con menos efectos a nivel cardiorrespiratorio ^(10,11).

I.1.3 Adaptación del músculo esquelético al ejercicio

El músculo esquelético es capaz de adaptarse a las demandas funcionales que se le imponen, y las modificaciones debidas al entrenamiento (adaptaciones) son específicas de los músculos utilizados, y no se dan en aquellos que no participan en el entrenamiento. En los deportistas de élite que practican disciplinas de resistencia aeróbica, como maratón o ciclismo en ruta, el porcentaje de fibras tipo I supera el 60-65%, mientras que en los deportistas de élite de disciplinas de fuerza y potencia, los músculos utilizados presentan porcentajes de fibras tipo II superiores al 65% ^(11,12).

El entrenamiento provoca adaptaciones musculares benéficas para un mejor desarrollo del ejercicio; así se han descrito modificaciones en la capilarización (aumento en actividades de resistencia aeróbica), en el diámetro de las fibras (hipertrofia, como ocurre en el entrenamiento de fuerza) o en el aumento de ciertas actividades enzimáticas (aeróbicas en las actividades de resistencia aeróbica, y anaeróbicas en las actividades de alta intensidad y fuerza) ⁽¹²⁾.

La hipertrofia muscular es el resultado de la acumulación de proteínas debida al aumento en la síntesis o reducción de la degradación o a ambas. Las fibras rápidas aumentan más su tamaño que las fibras lentas. En la hipertrofia muscular crónica, la hipertrofia de sus fibras musculares se debe a:

- Más miofibrillas.
- Más filamentos de actina y miosina.
- Más sarcoplasma.
- Más tejido conectivo.
- Una combinación de los factores anteriores.

La estimulación del músculo por distintos tipos de entrenamiento parece estimular las células satélite (mioblastos) situados bajo la membrana basal de las células musculares. La fusión de núcleos de las células satélite y su incorporación a las fibras musculares ya existentes probablemente permite a las fibras sintetizar más proteínas para formar nuevas miofibrillas, que contribuye directamente a la hipertrofia muscular con sobrecargas crónicas, y podría estimular la transformación de fibras existentes en distintos subtipos ⁽¹²⁾.

I.1.4 Adaptaciones orgánicas al ejercicio

Durante el ejercicio se producen modificaciones funcionales en los órganos del cuerpo:

I.1.4.1 Adaptaciones Metabólicas

El ATP es la única fuente directa de energía para formar y romper puentes transversales durante la contracción de los sarcómeros en el ejercicio. Los sistemas metabólicos musculares son:

- a) Reserva de ATP acumulados intracelularmente.
- b) Conversión de las reservas de alta energía de la forma de fosfocreatina a ATP.
- c) Generación de ATP mediante glucólisis anaeróbica.

d) Metabolismo oxidativo del acetil-CoA.

Con el comienzo del ejercicio de intensidad moderada a grande, la transferencia de fosfato y la glucólisis anaeróbica representan las fuentes iniciales de combustible para reponer el ATP consumido. Los niveles de glucógeno y fosfocreatina descienden rápidamente y aumenta la concentración de lactato en la célula. La preferencia inicial de estas vías metabólicas, está relacionado en parte con la velocidad de las reacciones para la producción de ATP. El metabolismo oxidativo es mucho más lento y además necesita una mayor captación de sustrato y O_2 , los cuales requieren un incremento del flujo sanguíneo. Una vez alcanzado este estado, la generación de ATP puede atribuirse casi por completo a la captación de O_2 y sustratos de la sangre ⁽¹³⁾.

Tanto en reposo como en ejercicio, el músculo esquelético utiliza ácidos grasos libres (AGL) como una de las principales fuentes de combustible para el metabolismo aeróbico. Para el músculo esquelético de cualquier capacidad aeróbica, el transporte de O_2 y sustratos (principalmente AGL) limita el nivel de rendimiento del trabajo submáximo de duración apreciable ⁽¹⁴⁾.

Regulación de la glucemia en el ejercicio: En el ejercicio de corta duración de baja a moderada intensidad, la concentración de glucosa en sangre prácticamente no se modifica con relación a la glucemia en reposo. Si es intenso puede observarse una elevación leve de la glucemia (20 a 30 mg/dl). En el ejercicio prolongado (más de 90 minutos) la glucemia desciende entre 10 a 40 mg/dl. El hígado representa el único sitio de producción y liberación de glucosa al torrente sanguíneo y debe tratar de equilibrar el consumo de glucosa por parte del músculo ^(15,16).

En reposo el índice de producción de glucosa hepática es de 150 mg/min., del cual el 75% es glucogenólisis y el resto es gluconeogénesis a partir de alanina, lactato, piruvato y glicerol. El ejercicio de corta duración el aumento de liberación de glucosa hepática es a expensas de la glucogenólisis. A medida que el ejercicio se prolonga hay mayor dependencia de la captación del precursor gluconeogénico para mantener la producción de glucosa hepática. La respuesta hormonal al ejercicio se caracteriza por descenso de insulina y aumento de glucagón. Además aumentan la somatotrofina, adrenalina, noradrenalina y cortisol. La importancia fisiológica de alteración del medio hormonal en el ejercicio se relaciona más con el estímulo de producción hepática de glucosa que con el aumento de utilización de esta ⁽¹⁷⁾.

I.1.4.2 Adaptaciones circulatorias.

Durante el ejercicio, el mayor requerimiento de O₂ por los músculos que se contraen es satisfecho por un aumento del aporte sanguíneo a los músculos, esto es posible porque el corazón bombea más sangre por minuto y porque ocurren adaptaciones circulatorias, que desvían gran parte del torrente sanguíneo desde tejidos menos activos hacia los músculos. Estas adaptaciones circulatorias no se circunscriben solamente a los músculos esqueléticos porque aumenta el requerimiento de O₂ del corazón y porque se debe evitar que se desvíe sangre desde el encéfalo hacia los músculos.

Por supuesto, el flujo sanguíneo a través de los pulmones debe aumentar en la misma proporción que el flujo en la parte sistémica de la circulación, pero sin que la velocidad se acelere tanto como para dificultar el intercambio gaseoso adecuado. Estos grandes cambios adaptativos de la circulación obedecen a la interacción de factores nerviosos y químicos. La adaptación circulatoria involucra a: I) presión sanguínea; II) control del flujo sanguíneo en los órganos; III) control sanguíneo a

través de los músculos esqueléticos, vasoconstricción compensadora durante el ejercicio; IV) flujo sanguíneo en los músculos en actividad.

I.1.4.3 Adaptaciones cardíacas.

En los períodos de reposo, los músculos almacenan sustancias nutritivas en cantidades suficientes como para iniciar y mantener el ejercicio hasta que se puedan movilizar las reservas, pero no tienen capacidad de almacenar O_2 , por lo que el aumento de las necesidades de O_2 debe ser satisfecho de dos maneras:

- Incremento del flujo sanguíneo para los músculos activos.
- Desviando sangre desde zonas menos activas.
- Aumentando el VM.
- Incrementando la extracción de O_2 de la sangre.

Se considera que el aumento del VM es la más importante de las respuestas adaptativas para incrementar la entrega de O_2 a los músculos en actividad siendo el factor que suele establecer el límite superior de la capacidad para el ejercicio.

I.1.4.4 Adaptaciones respiratorias.

I) Consumo de difusión de O_2 y ventilación pulmonar; II) efecto del entrenamiento sobre la VO_2 máx.; III) capacidad de difusión de O_2 ; IV) capacidad de difusión del O_2 ; V) gases sanguíneos.

I.1.4.5 Adaptaciones sanguíneas.

El recuento de **eritrocitos** con frecuencia está aumentado en los primeros momentos del ejercicio, probablemente por simple hemoconcentración (por transferencia de líquido sanguíneo a los tejidos). Durante ejercicios más prolongados el líquido pasa a la sangre por lo que hay hemodilución. Un esfuerzo muy agotador

puede causar incremento de la destrucción de los eritrocitos como consecuencia de compresiones capilares por la contracción muscular y el aumento de la velocidad del flujo sanguíneo, sobre todo en personas de hábitos sedentarios que practican en forma esporádica actividades físicas. Modificaciones de los **leucocitos** durante el ejercicio. El ejercicio de cualquier naturaleza aumenta el recuento leucocitario. En los primeros instantes del ejercicio intenso el aumento relativo de los leucocitos se debe sobre todo al mayor número de linfocitos, pero si el ejercicio se prolonga la elevación consecutiva depende casi exclusivamente del incremento de neutrófilos. Este aumento se produce muy rápidamente y se han registrado cifras de $35.000/\text{mm}^3$ (normal 5.000 a $10.000/\text{mm}^3$). La explicación más razonable es que gran número de células, que durante el reposo permanecen adheridas a las paredes de los vasos, son arrastradas a la circulación por el aumento del volumen y la velocidad del flujo sanguíneo ⁽¹²⁾.

Cuando mayor es el grado de estrés asociado con el ejercicio, mayor es la elevación del recuento de leucocitos. Un estrés de cualquier tipo (ejercicio agotador, excitación, ansiedad, etc.) determina mayor secreción de hormonas de la corteza suprarrenal, y uno de los efectos causados por éstas es la disminución del número de eosinófilos de la sangre.

El ejercicio acentúa la coagulación de la sangre, acompañado de mayor actividad fibrinolítica. Inmediatamente después del ejercicio se acorta el tiempo de coagulación, normalizándose a las pocas horas, probablemente por aumento de la actividad del factor antihemofílico. El aumento de la actividad fibrinolítica se debe a la mayor concentración de un activador del plasminógeno.

I.2 Fisiología del ejercicio.

Se define como el estudio de las adaptaciones o cambios temporales ocasionados por el ejercicio físico en la estructura y funciones de los órganos y sistemas que integran el cuerpo humano, a nivel molecular, celular, tisular, orgánico y sistémico.

I. 2.1 Adaptaciones hormonales

El ejercicio representa un estrés físico que desafía la homeostasis. En respuesta a este factor de estrés, el sistema nervioso autónomo y el *eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal* son conocidos por reaccionar y participar en el mantenimiento de la homeostasis. Esto incluye la elevación de cortisol y las catecolaminas en plasma. Sin embargo, el acondicionamiento físico sostenido en atletas altamente entrenados se asocia con una respuesta *hipotálamo-pituitario-adrenal* disminuida al ejercicio. Por otro lado, los atletas altamente entrenados exhiben un *hipercortisolismo* crónico leve en la línea base que puede ser un cambio adaptativo para el ejercicio crónico. Por otra parte, el ejercicio estimula la secreción de *GH* y *prolactina*, y puede influir en el tipo de la inmunidad mediante la estimulación de la respuesta *TH2*. Además, el estrés del ejercicio inhibe la función gonadal, a través de la producción de *glucocorticoides* y *catecolaminas*, así como mediante la activación de la *CRH* de las neuronas. Hoy en día, aparte de los efectos benéficos del ejercicio, cada vez hay más incidencia de corto relacionado con el ejercicio y las consecuencias a largo plazo, sobre todo en relación con la mujer atleta que muchos autores describen como la llamada "*disfunción reproductiva femenina relacionada con el ejercicio*". Estas consecuencias incluyen la amenorrea, infertilidad, trastornos de la alimentación, la osteoporosis, la enfermedad coronaria y el síndrome eutiroideo "enfermo" ⁽¹⁷⁾ (Figura 5).

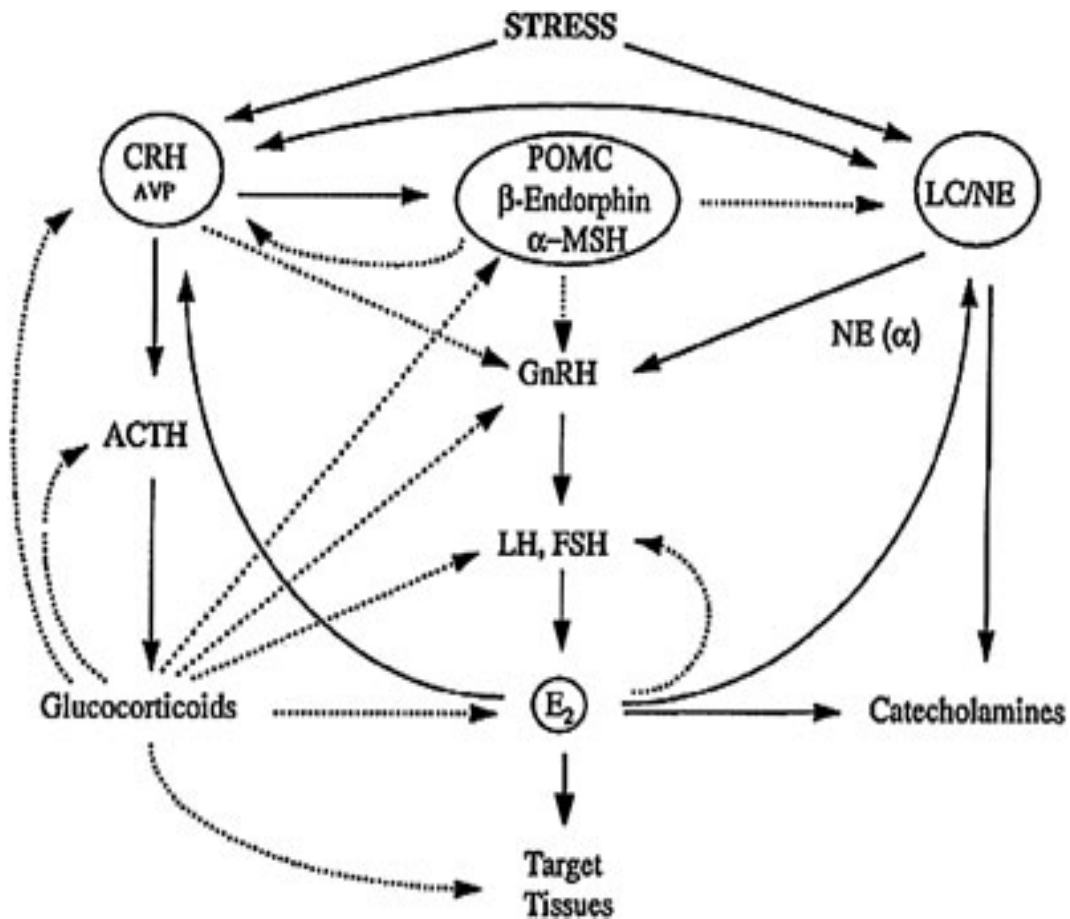


Figura 5. Interacción del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal con el eje hipotálamo-hipófisiario-gonadal. Las líneas punteadas representan represión mientras que las continuas representan estimulación.

1.2.2 Cortisol

Principal glucocorticoide de la corteza adrenal, destaca entre sus efectos fisiológicos: 1) acción hiperglucémica, mediante la estimulación de la gluconeogénesis y su oposición a los efectos periféricos de la insulina; 2) promueve el metabolismo proteico y la descomposición de las proteínas en sus aminoácidos correspondientes para su utilización en los procesos gluconeogénicos; y 3) movilización de ácidos grasos desde el tejido adiposo e incremento de cuerpos cetónicos en el hígado.

La respuesta del cortisol al ejercicio varía debido al nivel de entrenamiento del sujeto, la intensidad y duración del ejercicio y del estado nutricional entre otros,

estudios sugieren que el ejercicio físico de intensidad moderada tiene poco efecto sobre el cortisol, mientras que en el ejercicio prolongado, las concentraciones plasmáticas de cortisol aumentan.

En el maratón, un ejercicio de intensidad baja o moderada, hay mucha producción de cortisol (la llamada hormona del estrés), lo cual tiene sentido, ya que crea un ambiente de estrés y el desgaste en el cuerpo durante este ejercicio. El cortisol promueve a los músculos “quemadores” del estado catabólico. Dado que el ejercicio de alta intensidad, como las carreras cortas, producen en grandes cantidades cortisol además de la hormona del crecimiento y la testosterona, principalmente; se intensifica la quema de grasa y conduce a una musculatura de tipo anabólico. Es por esto, que los corredores de maratón son delgadas y velocistas son musculares ⁽¹¹⁾ (Tabla 2).

Tabla 2. Adaptación hormonal al ejercicio.

METABOLISMO					
ANABOLISMO			CATABOLISMO		
Hormona		Característica	Hormona		Característica
Cortisol		Entrenamiento largo y exhaustivo	GH Testosterona Insulina como factor de crecimiento		Ejercicio de larga intensidad y poco volumen
Función metabólica	Consecuencias		Función metabólica	Consecuencias	
Destrucción, degradación, gasto y pérdidas	Aumenta disponibilidad de nutrientes al organismo	Mayor daño a tejido muscular INDIVIDUO DELGADO	Almacenamiento, síntesis, producción y ganancias	Crecimiento, regeneración y mantenimiento de tejidos y órganos	HIPERTROFIA MUSCULAR

Hormonas producidas durante el ejercicio.

I.2.3 Energía durante el ejercicio

La célula del músculo esquelético requiere de energía durante el ejercicio utilizando sustratos que proceden de reservas obtenidas fundamentalmente de las grasas, hidratos de carbono y proteínas, en ese orden. Todos ellos ceden la energía contenida en sus enlaces químicos para la fosforilación del adenosín trifosfato (ATP), ya que la célula muscular sólo es capaz de obtener directamente la energía química de este compuesto de alta energía y transformarla en energía mecánica.

La energía química es transformada en energía mecánica gracias a la realización de cambios conformacionales de la estructura molecular de las proteínas contráctiles del músculo, lo que modifica la longitud del sarcómero, acortándolo, lo que da lugar a un aumento de la tensión generada por el músculo, lo cual a su vez se traduce en la posibilidad de generar movimiento.

Por tanto, la actividad muscular dependerá de la actividad del sistema nervioso que desencadena el proceso y de las características estructurales y bioquímicas del músculo, así como de los diferentes sistemas metabólicos que permiten una reposición adecuada del ATP.

Proceso metabólico = serie de reacciones químicas consecutivas que tienen lugar por ejemplo, en una ruta metabólica en la que un producto inicial se transforma en un producto final con transformaciones intermedias.

Proceso exergónico, hay liberación neta de energía = Catabólico

Exergónico: $A \longrightarrow B + \text{energía libre}$

Proceso endergénico, es preciso un aporte neto de energía = Anabólico

Endergónico: $A + \text{energía libre} \longrightarrow B$

Durante el ejercicio debe obtenerse un equilibrio perfecto entre la hidrólisis del ATP y su resíntesis. La célula muscular dispone de tres mecanismos para resintetizar el ATP, mecanismos que desde el punto vista bioenergético son procesos exergónicos que liberan la energía necesaria para conseguir sintetizar ATP a partir de adenosín difosfato (ADP). Estos mecanismos son (Figura 6):

La resíntesis de ATP a partir de la fosfocreatina (PCr),

1. Mediante el proceso de la glucólisis anaeróbica con la transformación del glucógeno muscular en lactato, y
2. A partir de la fosforilación oxidativa.

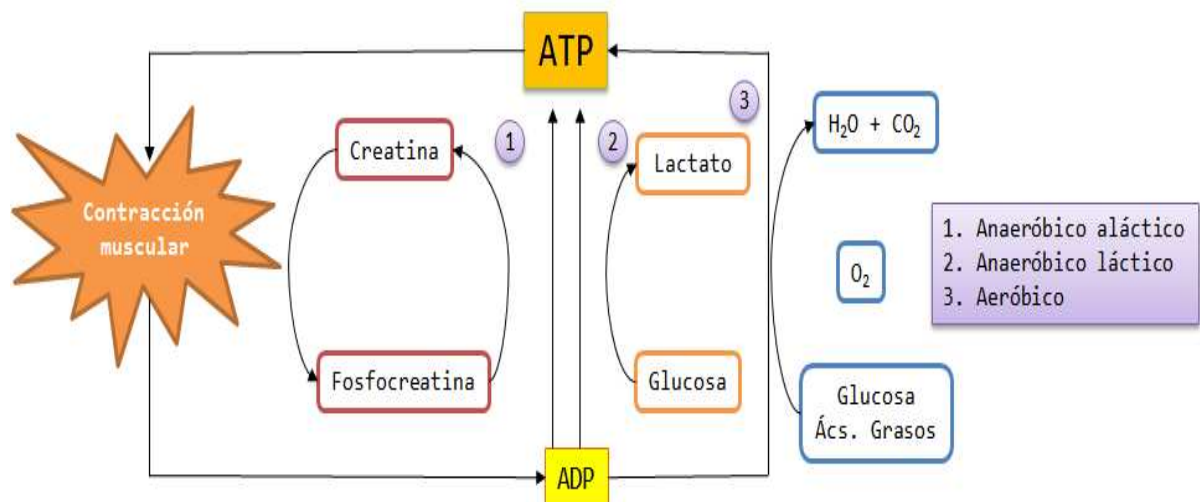


Figura 6. Síntesis de ATP muscular. Sistema de producción de ATP en el músculo esquelético.

El sistema de producción de ATP implica dos mecanismos en condiciones anaeróbicas, todas las reacciones químicas acontecen en el citosol celular. Por el contrario, la fosforilación oxidativa (u oxidación celular) es un proceso aeróbico realizado en el interior de las mitocondrias. La oxidación celular proporciona la mayor parte de la energía para la fosforilación a partir de la combustión biológica de los

macronutrientes de la dieta. En ella se produce un acoplamiento entre las reacciones de oxidación y las de reducción, ya que cada oxidación coincide con una reducción. Proceso que proporciona de forma continua átomos de hidrógeno procedentes del catabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas almacenados.

Por lo anterior, el metabolismo del músculo puede ser aeróbico o anaeróbico, dependiendo de diversos factores entre los que destaca indudablemente la intensidad del ejercicio (tasa a la que es necesario reponer el ATP).

De acuerdo al momento, el sistema energético será diferente en la función del tipo de sustrato a utilizar, clasificándose en:

- Metabolismo de los fosfágenos (sustratos ATP y fosfocreatina).
- Metabolismo de los hidratos de carbono.
- Metabolismo de las grasas.
- Metabolismo de las proteínas.

El ATP se acopla entre las proteínas contráctiles actina y miosina anclándolas y provocando la contracción de la fibra muscular; se obtiene de forma inmediata por el sistema de *creatin fosfato/creatin fosfoquinasa*. Es la reserva más pequeña y la utilización máxima **que** se agota en aproximadamente 4 segundos (datos más recientes sugieren 30 segundos). Esta es una importante fuente de fosfato de alta energía para los velocistas. La siguiente mayor fuente de energía es la glucólisis anaeróbia, los sustratos que la activan son el *glucógeno*, almacenado en los músculos y *glucosa* en la sangre. Posteriormente, la glucólisis aerobia se activa suministrando suficiente energía para la actividad muscular de varias horas (dependiendo de la intensidad). La oxidación de ácidos grasos tiene la capacidad de producción de ATP en mayor cantidad. Esto es relativamente lento, pero puede producir energía durante

muchas horas si la intensidad del trabajo corresponde a la tasa de producción de ATP^(11,13) (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de consumo energético en el ejercicio

Ejercicio (min)		0	40	90	180	240
Consumo (%)	Glucosa	4	27	41	36	30
	AGL	96	38	37	49	61
	Otros	0	35	22	15	9

I.2.4 Glutamina

La Glutamina, es el más abundante de los aminoácidos libres en el cuerpo humano, la concentración plasmática normal es de 550-750 $\mu\text{mol/L}$, mientras que en el músculo esquelético es de aproximadamente 20 mmol/kg de peso, y libera a la circulación sanguínea aproximadamente 50 mmol/h⁽¹⁷⁾. Se describe como el vehículo fisiológico principal de nitrógeno entre los diferentes tejidos de mamíferos^(18,19). El músculo esquelético humano produce el 70% de la glutamina endógena^(20,21), aproximadamente el 15% de la proteólisis y el resto de la síntesis de novo^(20,22,23).

Aunque es clasificado como no esencial, evidencias sugieren que la glutamina es condicionalmente esencial cuando se agota rápidamente en la sangre en situaciones de estrés⁽²²⁾. Concentraciones de glutamina en plasma disminuyen sustancialmente por un traumatismo clínico como en la cirugía mayor o después de ejercicio prolongado y exhaustivo⁽²⁴⁾. La glutamina actúa como un donante de nitrógeno para la síntesis de purina y pirimidina para nuevos nucleótidos de ADN, la reparación de ARNm, la síntesis de aminoácidos, carbamoilfosfato, amino azúcares y

otros metabolitos. Desempeña un papel clave en el metabolismo del nitrógeno y representa una forma de almacenamiento y transporte de glutamato y amoníaco. Por estas razones, el glutamato y amoníaco derivados de glutamina desempeñan funciones fisiológicas cruciales en muchos tejidos, con especial relevancia en el cerebro, hígado y el riñón. La glutamina intercelular entre hepatocitos periportal y perivenosos es importante para la regulación del ciclo de la urea en el hígado con implicaciones para la desintoxicación de amoníaco y la regulación del pH sistémico (14).

La glutamina es también un sustrato esencial para algunas células clave del sistema inmune, tales como macrófagos y linfocitos (25). Se ha demostrado que hay una muy alta tasa de consumo de glutamina no sólo por las células tumorales, sino también por las células proliferantes normales (26). La vía de degradación mayor para L-glutamina se lleva a cabo en las mitocondrias y se inicia por la glutaminasa activada por la enzima fosfato de (GA; EC 3.5.1.2) (27; 28,29). McKeehan (1982) (30) en primer lugar postula que la ruptura de la glutamina a piruvato es un proceso lineal mitocondrial. Según Moreadith y Lehninger (1984) (31), hay una compartimentación citosol / mitocondrias del proceso **glutaminolytic**. Por último, McKeehan (1986) (32) afirma que glutaminolysis puede ocurrir por completo dentro de la mitocondria, aunque también puede llevarse a cabo como un proceso compartamentado.

La concentración de glutamina en el plasma es una consecuencia del equilibrio entre la síntesis de glutamato y amoníaco por la glutamina sintetasa en una reacción dependiente de ATP (33), y la liberación y el consumo por varios órganos, incluyendo los riñones, el hígado, el corazón y el cerebro. Concentraciones de glutamina reducida puede reflejar cambios metabólicos **tañes** como el agotamiento de glucógeno y los

cambios en el metabolismo de los aminoácidos en el músculo esquelético, o las altas tasas de consumo en otros tejidos ^(33,34)

Varios estudios han demostrado una disminución en la concentración plasmática de glutamina después del ejercicio exhaustivo en los seres humanos y animales ^(35,36,37,38,39) y en la presencia del síndrome de sobreentrenamiento ^(40,41)

La glutaminólisis es una vía de producción de energía; en contraste con la producción de energía glicolítica, la producción de energía por la glutaminólisis depende del suministro de oxígeno.

A la conversión del aminoácido glutamina en lactato, se le ha denominado en analogía a la glucólisis, glutaminólisis; las etapas de reacción de la glutaminólisis se llevan a cabo parte en el citosol y parte en la mitocondria (Figura 7).

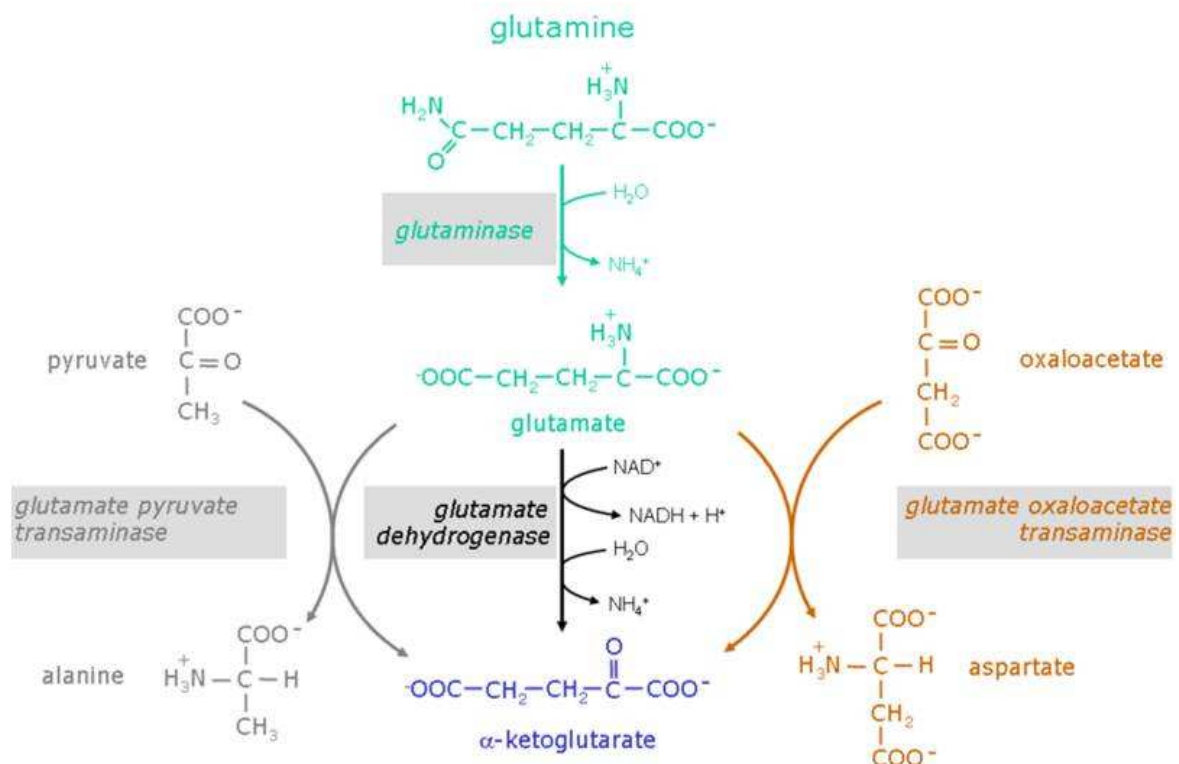


Figura 7. Vía de la glutaminólisis

La glutaminasa de mamíferos cataliza la desamidación de la glutamina hidrolítica a los iones de glutamato y de amonio. Dos genes distintos en cromosomas separados que codifican isoenzimas han sido identificados en mamíferos; en los seres humanos, el gen GLS es situado en el cromosoma 2 y codifica el tipo de riñón (K) de isoenzimas; el segundo locus es el gen Gls2 localizado en el cromosoma 12 y la codificación para la isoenzima tipo hepática (L) ⁽⁴²⁾. A partir de cada gen, al menos dos isoformas se han informado hasta el momento: dos isoformas GA de tipo K nombradas KGA y GAC se derivaron del gen de GLS, y dos L. ^(43,44) Varios estudios han demostrado una disminución en la concentración plasmática de glutamina después del ejercicio exhaustivo en los seres humanos y animales

La demanda de glutamina aumenta con el aumento del estrés físico y mental, así como con mayores niveles de estrés. Es una fuente de carbono y nitrógeno, así como una base importante para la formación y mantenimiento de los músculos

La glutamina es el aminoácido más importante para la regulación del equilibrio ácido-base. Puede disociar el amoníaco en los riñones, proceso conocido como reacción de la glutaminasa en donde se elimina el ácido, por una parte, y, por otra, se ahorra bicarbonato.

I.2.5 Myc oncogen

Myc ha sido pionera, en las bases moleculares del cáncer, así como en el funcionamiento como centro fundamental de control para varios procesos biológicos y diversos mecanismos de regulación y además, de ser de los primeros oncogenes identificados ⁽⁴⁵⁾. El papel de la familia de genes *myc* en la biología de células normales y cancerosas se ha estudiado intensamente desde principios de 1980. Genes *myc*, en

respuesta a diversas señales externas e internas, exocesa diversos factores de transcripción (el c-, N-, y L-Myc) que se heterodimerizan con Max, se unen al ADN, y modulan la expresión de un conjunto específico de genes diana. En los últimos años, el perfil de expresión, estudios de unión genómica y análisis genéticos en mamíferos y *Drosophila* han dado lugar a una visión ampliada de la función Myc ⁽⁴⁶⁾.

Teniendo en cuenta el papel de Myc en la activación e inhibición de genes, varios estudios indican que los perfiles de sobreexpresión de Myc modula “cientos de miles” de genes ^(47,48,49,50). Patel et al (2004) ⁽⁵¹⁾ mencionan por ejemplo, que Myc influye en la regulación de genes con amplia gama de funciones biológicas, dirigidos hacia el crecimiento celular (definida como un aumento de la masa celular): biogénesis de los ribosomas, síntesis y metabolismo de proteínas, para lo cual el metabolismo energético también es un aspecto esencial del crecimiento y proliferación celular. Anteriormente la función de Myc había sido relacionado con el estímulo de la transcripción del gen lactato deshidrogenasa-A (LDH-A) ⁽⁵²⁾, así como un grupo de genes nucleares implicados en la función mitocondrial ⁽⁵³⁾. Se ha mostrado que Myc promueve la fosforilación oxidativa así como la glicólisis a través de coordinar el control transcripcional de la red metabólica mitocondrial ^(54,55).

El renovado interés en el efecto y el metabolismo de las células tumorales por el efecto Warburg ha puesto de relieve un nuevo papel para Myc. Ya que además de estimular la biogénesis mitocondrial, se ha demostrado que niveles del oncogén de Myc promueven la glutaminólisis ^(56,57,58). Este aumento de crecimiento de las células combustibles metabolismo de la glutamina y la proliferación, que son esenciales para las células tumorales para prosperar. También ha habido sugerencias de que las células tumorales se vuelven adictos a la glutamina, que puede proporcionar oportunidades para la intervención terapéutica ⁽⁵⁶⁾.

Se sabe menos acerca de la regulación de la absorción y el metabolismo de la glutamina. En este caso, informes indican que las propiedades reguladoras de la transcripción del oncogén Myc es coordinar la expresión de genes necesarios para que las células se involucren en el catabolismo de glutamina que excede el requisito celular para la proteína y la biosíntesis de nucleótidos. Una consecuencia de esta glutaminolysis Myc-dependiente es la reprogramación del metabolismo mitocondrial dependiente del catabolismo de glutamina para mantener la viabilidad celular y la anaplerosis ciclo TCA. La capacidad de las células que expresan MYC-a participar en la glutaminolysis no depende de la activación concomitante de PI3K o AKT. La estimulación del metabolismo de la glutamina mitocondrial resultó en una reducción de carbono de glucosa que entra en el ciclo de TCA y una disminución de la contribución de la glucosa para la síntesis mitocondrial dependiente de fosfolípidos. Estos datos sugieren que los niveles oncogénicos de *Myc* inducen un programa transcripcional que promueve glutaminolysis y desencadena la adicción celular a la glutamina como un sustrato bioenergético.

Además de la glucosa, glutamina puede ser un nutriente esencial para el crecimiento celular y la viabilidad ^(56,57). En adicción vitro a la glutamina como un sustrato bioenergético se observó primero en células HeLa pero no se encontró que era una propiedad universal de líneas celulares de cáncer. La inducción de la expresión de Myc resultó en la inducción de los transportadores de glutamina, glutaminasa, y lactato deshidrogenasa A (LDH-A). La inducción de estos genes reguladores clave que participan en glutaminolysis correlacionado con los aumentos inducidos-Myc en la captación de glutamina y el flujo de la glutaminasa ⁽⁵⁸⁾ (Figura 8).

II y III. PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la glutaminólisis ha tenido gran importancia dado que en el área del deporte, del ejercicio y de los profesionales de élite se emplea rutinariamente el uso de glutamina para evitar la pérdida de masa muscular.

Además se ha demostrado que es un sustituto energético emergente durante las sesiones de ejercicio extenuante, evitando las reacciones y consecuencias de la anaerobiosis, y así un estado acidótico sobre todo en los atletas de élite ^(46,47,48).

Sin embargo, hay pocos estudios que relacionan el papel de la glutaminólisis y sus reguladores como el cortisol y Myc durante las sesiones de ejercicio extenuante previo acondicionamiento o sin él ^(49,50). Por lo que surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será el efecto del ejercicio extenuante (sesión de nado prolongado) sobre el metabolismo y regulación de la glutamina en músculo esquelético e hígado en ratones machos BALB/c de 12 meses?

III. OBJETIVO E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar el efecto del ejercicio extenuante (sesión de nado prolongado) sobre el metabolismo y regulación de la glutamina en el músculo esquelético e hígado de ratones machos BALB/c de 12 meses.

Objetivos específicos

- Determinar la expresión relativa de mRNA de los genes de la glutaminólisis tales como glutaminasa (GLS), glutamato deshidrogenasa 1 (GLUD 1) y glutamato sintetasa (GS), en músculo esquelético e hígado de ratones BALB/c en el ejercicio moderado y extenuante.
- Determinar la expresión relativa de mRNA del gen regulador Myc en músculo esquelético e hígado de ratones BALB/c en el ejercicio moderado y extenuante.
- Determinar niveles de corticosterona plasmática de ratones BALB/c durante el ejercicio moderado y extenuante.

IV. JUSTIFICACIÓN

IV. JUSTIFICACIÓN

Se han reportado los efectos del ejercicio extenuante sobre el metabolismo de la glutamina en músculo esquelético de modelos humanos y murinos posterior a un periodo de reposo. En virtud de que son limitados los estudios que evalúan el efecto del ejercicio extenuante sobre el metabolismo de la glutaminólisis inmediatamente después de la intervención, nos enfocamos en este efecto comparándolo versus a un estado basal y ejercicio moderado en ratones BALB/c de 12 meses, y como el alfa-cetoglutamato proporciona esqueletos de carbono en la mitocondria como intermediario del TCA.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Tipo de estudio

Ensayo clínico controlado, aleatorizado longitudinal, prospectivo, de intervención deliberada y en paralelo (con controles concurrentes en el tiempo y espacio).

VARIABLE INDEPENDIENTE:

- Intervención con ejercicio aeróbico moderado (nado tres veces por semana).
- Intervención con ejercicio extenuante (5.5 hrs de nado continuo) previa eutanasia.

VARIABLE DEPENDIENTE:

Genes que intervienen en la síntesis de glutamina

- Glutaminasa 1 (Gls 1)
- Glutamato deshidrogenasa (Glud)

Gen que interviene la formación de glutamina

- Glutamina sintasa (GS)

Regulador del metabolismo y captación de la glutamina

- Oncogén c-MYC

Regulador del gen formador del Glutamato a Glutamina

- Corticosterona

V.2. Conformación de los grupos

Criterios de selección: Tabla 4.

Tabla 4. Criterios de selección.

CRITERIOS DE SELECCIÓN		
Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión	Criterios de Eliminación
<ul style="list-style-type: none">• Ratones de la cepa BALB/c• Tener 8 semanas de vida• Peso entre 16 y 18 gr.• Ratones machos.	<ul style="list-style-type: none">• Ratones con gérmenes patógenos	<ul style="list-style-type: none">• Desarrollo de tumores• Desarrollo de infecciones resistentes• La no adaptación a la dieta• Pérdida de peso considerable.• Muerte

El ensayo se realizó durante un periodo de 61 semanas; las pruebas se realizaron en el animalario, en el laboratorio de bioquímica y de biología molecular de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Con una población de 24 ratones machos de la cepa BALB/c, y una muestra de 4 grupos de 6 ratones para ser analizados. A partir de su llegada en la semana 8 de vida, los animales fueron separados individualmente y mantenidos en un ciclo de luz/obscuridad (12:12) entre 18 a 22°C, con libre acceso al agua y alimentados con una dieta tipo NIH-31 *ad libitum*, adquirida de los Laboratorios Harlan, esta dieta se usa en los Institutos Nacionales de

Salud como la dieta de referencia estándar para la investigación biológica y biomédica y es ampliamente usada para la producción comercial de colonias de ratas y ratones. Los animales fueron manejados de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional ⁽⁵⁹⁾.

V.3 Conformación de los grupos para las intervenciones

Se utilizaron ratones machos BALB/c, con los cuales se formaron aleatoriamente cuatro grupos, todos de n=6, (Figuras 9A y 9B). Al llegar al animalario del área de posgrado de la Escuela Superior de Medicina, fueron adaptados a su nuevo hábitat durante 4 semanas, fueron colocados individualmente en jaulas de policarbonato de 30 x 20 x20, bajo condiciones controladas de temperatura (18-24°C) y con ciclos luz-obscuridad de 12 x 12 (de 07:00 a 19:00 horas) (Figura 9 C).



Figura 9 A, B, C. Ratones seleccionados aleatoriamente en grupos. Ratones machos BALB/c colocados individualmente en jaulas.

Se formaron 4 grupos: Tabla 5.

Tabla 5. Descripción general de los cuatro grupos y sus diferentes intervenciones.

Grupo SED	<ul style="list-style-type: none"> Grupo 1. Grupo control o testigo, sedentario (SED). Este grupo se tomó como parámetro de referencia de un estado basal sedentario, alimentados con dieta de tipo NIH-31 ad-libitum.
Grupo EAM	<ul style="list-style-type: none"> Grupo 2. Grupo con Ejercicio Aeróbico Moderado (EAM). Grupo de ratones alimentados con dieta de tipo NIH-31 de forma ad-libitum, acondicionados al ejercicio y mantenidos con ejercicio aeróbico moderado.
Grupo SED/EE	<ul style="list-style-type: none"> Grupo 3. Grupo sedentario con ejercicio extenuante (SED/EE). Ratones con dieta tipo NIH-31 ad-libitum, entrenados para nado y expuestos a nado exhaustivo, durante 5.5 horas previo a su sacrificio.
Grupo EAM/EE	<ul style="list-style-type: none"> Grupo 4. Grupo con Ejercicio Aeróbico Moderador y Ejercicio Extenuante (EAM/EE). Grupo de ratones alimentados con dieta de tipo NIH-31 ad-libitum, acondicionados al ejercicio y mantenidos con ejercicio aeróbico moderado y expuestos a nado exhaustivo durante 5.5 horas, previo a su sacrificio.

Los ratones fueron pesados al llegar y cada semana; en la tabla 6 se muestran los pesos a las 3 semanas de edad, a los 6 y 12 meses de intervención.

Tabla 6. Peso de los ratones

Grupo	Ratón	3 semanas	6 meses	12 meses
SED	1	20.7	30.1	33.4
	2	22.3	31.8	28.6
	3	19.1	30.2	31.5
	4	20.1	26.6	25.9
	5	22.4	26.6	26.3
	6	23.1	31.4	33.8
EM	1	21.8	30.1	32.5
	2	22.5	30.1	31.1
	3	20.2	30.7	31.2
	4	22.3	26.7	33.5
	5	21.1	26.9	29.6
	6	19.7	29.1	27.7
SED/SPN	1	20.7	31.2	35.4
	2	19.5	32.7	33.2
	3	21.9	30.6	31.5
	4	20.3	30.7	25.4
	5	21.1	30.6	31.5
	6	20.2	28.6	29.9
EM/SPN	1	20.4	30.7	30.3
	2	20.7	30.1	28.2
	3	22.2	29.7	28.2
	4	20.1	31.5	32.1
	5	20.4	27.0	32.6
	6	21.3	31.6	32.5

V.4 Intervenciones

Adaptación al nado: es una preparación mínima requerida para los ratones que fueron sometidos a un programa de entrenamiento moderado, o bien a un programa de nado continuo de 5.5 horas, que llamaremos ejercicio extenuante. Incluyó 6 sesiones de natación realizadas de la siguiente manera: el primer día, los ratones nadaron 10 minutos, seguido de incrementos diarios de 10 minutos hasta llegar a 60 minutos.

Programa de entrenamiento moderado, los ratones en la semana 18 de vida, se adaptaron al protocolo de nadó, desde la semana 19, los ratones nadaron 60 minutos por día, tres veces por semana hasta su sacrificio. Para las sesiones de entrenamiento, cada ratón se colocó en un recipiente de plástico transparente con agua a su capacidad media. Durante la natación, los ratones podían ver hacia el exterior nadar a los otros ratones, y así orientarse en su entorno. La temperatura del agua fue de 30 a 32 ° C. Después de cada sesión de natación, los ratones se secaron con una toalla para evitar cambios de temperatura corporal repentina. En caso de comportamiento flotante, el ratón fue suavemente empujado con un dedo, suficiente estímulo con un mínimo de estrés adicional (Figura 10).



Figura 10. Ratones nadando. Los ratones se colocan en piscinas de plástico transparente individuales para nadar.

Tamaño de la muestra

Población de 24 ratones machos de la cepa BALB/c y una muestra de 4 grupos de 6 ratones para ser analizados de 61 y 62 semanas de edad.

V.5 Tratamientos

Todos los ratones BALB/c de cada uno de los grupos, fueron alimentados con dieta NIH-31, a partir de que llegan al bioterio con 8 semanas de vida y esta se mantiene de por vida

- V.5.a. Grupo 1. Grupo control o testigo, sedentario (SED). Este grupo se tomó como parámetro de referencia de un estado basal sedentario, se sacrificó en la semana 61 sin haber sido entrenados para la natación y sin episodio de natación exhaustiva.

- V.5.b. Grupo 2. Grupo sedentario con ejercicio extenuante (SED/EE). Ratones adaptados al nado y expuestos a nado continuo exhaustivo durante 5.5 horas, previo a su sacrificio. Adaptación al nado: En la semana 60 y 61 fueron entrenados previamente para el nado exhaustivo, iniciando con 10 minutos de nado e incrementándolo de 10 en 10 en cada día hasta 60 minutos y después dos sesiones de 60 minutos, sumando en total 8 sesiones de entrenamiento. El día de su sacrificio a la semana 62 de vida, se les sometió a nado exhaustivo por un tiempo de 5.5 hrs. Todas las sesiones de natación se llevaron a cabo en un recipiente de acrílico de 30 x 20 x 20, con el agua a 32° C.
- V.5.c. Grupo 3. Grupo con Ejercicio Aeróbico Moderado (EAM), ratones adaptados al nado, mantenidos con nado continuo, tres veces por semana, con un tiempo de 60 minutos por sesión (ejercicio aeróbico moderado). A este grupo se le adaptó al nado en la semana 12 de su vida, se le entrenó iniciando con 10 minutos de nado e incrementándolo de 10 en 10 en cada día hasta 60 minutos y después 3 sesiones de 60 minutos por semana, hasta el día de su sacrificio en la semana 62.
- V.5.d. Grupo 4. Grupo con Ejercicio Aeróbico Moderado y Ejercicio Extenuante (EAM/EE), ratones adaptados al nado, mantenidos con nado continuo, tres veces por semana, con un tiempo de 60 minutos por sesión (ejercicio aeróbico moderado) y una última sesión de nado exhaustivo de 5.5 horas. al día de su sacrificio. A este grupo se le adaptó al nado en la semana 12 de su vida, se le entrenó iniciando con 10 minutos de nado e incrementándolo de 10 en 10 en cada día hasta 60 minutos y después 3 sesiones de 60 minutos por semana y al día de su sacrificio se les sometió a nado exhaustivo de 5.5 horas (semana 61 de vida) (Figura 11).

Diseño experimental

Línea de vida

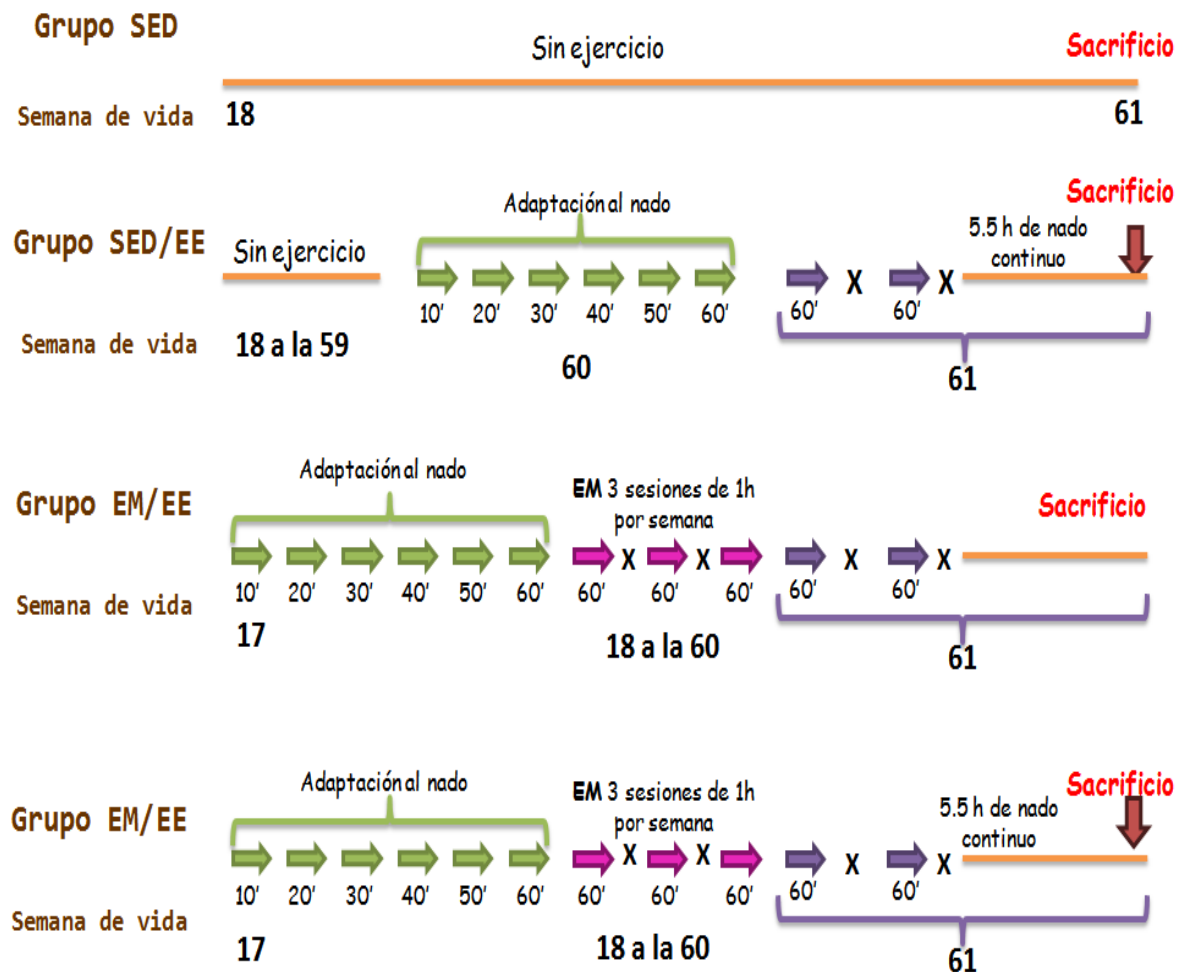


Figura 11. Diseño experimental. Se muestran las semanas de vida de los ratones al inicio de cada una de las intervenciones, hasta su sacrificio.

V.6 Obtención de muestras biológicas

Se realizó eutanasia por dislocación cervical, posteriormente se aplicó punción directa a corazón, para obtener sangre total utilizando jeringa para tuberculina de 1 ml permeada con heparina, una vez obtenida la sangre se deposita sin aguja (para evitar hemolisis) en un microtubo de 1.5 ml, se centrifuga a 3500 RPM durante 10 min., se

obtuvieron tres fases; la fase profunda roja que correspondió al paquete globular, la fase media blanca al paquete plaquetario y la fase superficial amarillo transparente al plasma; se obtuvo el plasma y se colocó en un nuevo microtubo B HN de 1.5 ml y se resguardó en ultracongelación a -70°C hasta su uso. Se realizó una incisión media abdominal en dos planos para obtener muestra del lóbulo izquierdo del hígado. Se continuó con la disección del miembro inferior y se obtuvo una muestra de músculo **gastrocnemio**, se colocaron en microtubos de 2 ml individualmente y se resguardaron en ultracongelación (-70°C) hasta su uso (Figuras 12A, 12B.)

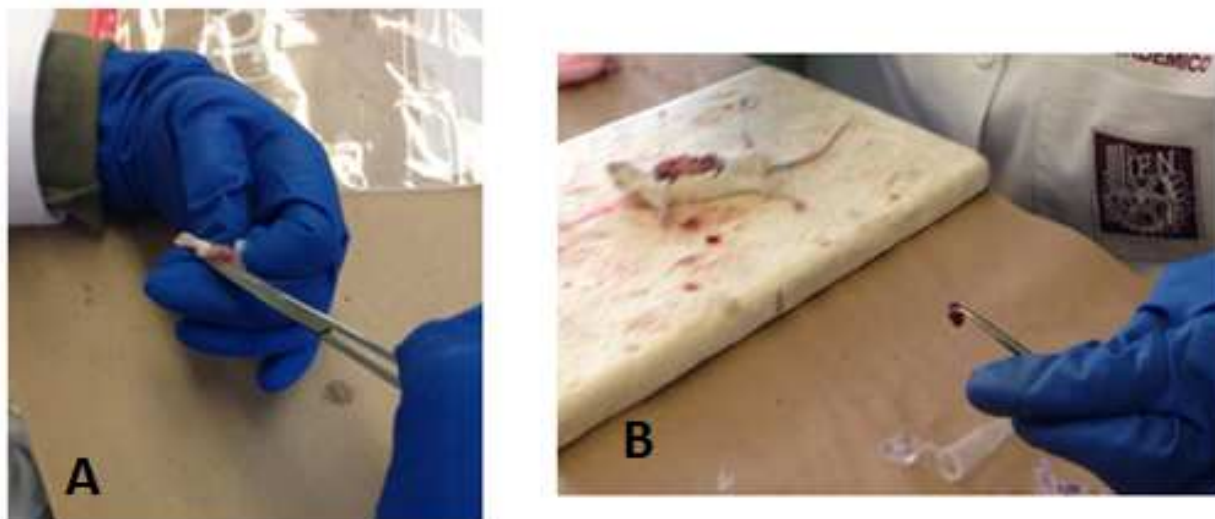


Figura 12 A, B. Obtención de muestras biológicas. Obtención de muestra de A) Músculo esquelético, B) Hígado.

Aislamiento de ARN total

El aislamiento del ARN total de las **mucosas** almacenadas de los diferentes grupos se realizó con el método de guanidina de tiocinato con Trizol ⁽⁶⁰⁾ (Figura 13).



Figura 13. Muestra con Trizol **A las muestras** se les agregó Trizol para homogenizar las muestras de músculo esquelético e hígado.

V.7 Aislamiento de ARN total:

El aislamiento del ARN total **de** músculo esquelético e hígado, almacenados de los diferentes grupos se realizó con el método de Guanidina de tiocinato con TRIzol® (Invitrogen).

1. Se colocaron de 50 a 80 mg de muestra (músculo esquelético o hígado) en un mortero y se agregó nitrógeno líquido para pulverizar la muestra, se colocó el polvo en el mismo microtubo donde se conservaba la muestra.
2. Se agregó 1 ml de TRIzol® (para lisar las células, el fenol que compone esta solución estabiliza el ARN y ADN para no destruirlos) al microtubo y se

homogenizó en la vortex a temperatura ambiente para permitir la disociación de complejos de nucleoproteínas.

Separación de fases:

3. Se agregó cloroformo 0.2 mL/1mL. de TRIzol® (para separar heterodímeros de ácidos nucleicos), se mezcló vigorosamente en vortex durante 15 segundos, se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Se Centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a temperatura de 4°C, para obtener tres fases; 1) fase superficial o acuosa (contiene ARN total), 2) fase intermedia y 3) fase inferior u orgánica (contiene proteínas).
5. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo libre de ADNsas y ARNsas. (Figura 14)



Figura 14. Separación de fases. Obtención del RNA, donde solo se obtiene la fase acuosa.

Precipitación de ARN:

6. Se agregó isopropanol 0.5 mL./1mL. de TRIzol® (precipita el ARN o ADN, debido a la cantidad de cargas negativas que compiten con el agua), se mezcló cuidadosamente, se dejó interactuar 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm 15 minutos a 4°C.
7. Se observó un precipitado blanco pequeño (botón) llamado “pellet”. Decantar el sobrenadante.

Lavado de ARN:

8. Se agregó 1mL de etanol al 80% para lavar el “pellet” por cada miliro de TRIzol®, se homogenizó vigorosamente durante 1 minuto en vortex, se centrifugó a 7,500 rpm, 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, se lavó dos ocasiones más y se dejó secar parcialmente a temperatura ambiente el “pellet” (no se secó totalmente, para evitar insolubilidad).
9. Se agregó agua DEPC (di-etil pirocarbonato) libre de DNAsas o RNAsas, para que se conservara el ARN y disolver el ARN del “pellet”, se incubó en baño María a 55°C durante 5 minutos.

Determinación de concentración y pureza del ARN:

10. Se determinó la concentración y pureza del ARN midiendo su densidad óptica a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro (lo realizamos en un espectrofotómetro marca Genesys). El ARN se cuantificó empleando la siguiente fórmula:

$\text{mgARN/mL} = \text{dilución} \times \text{As}_{260} \times 40$. Ejemplo: Concentración de ARN = absorbancia a 260 nm x dilución (250) x 40 = ARN mg/mL.

Pureza: Exceso de proteína = D.O. a 260 nm / D.O. a 240 nm = ó > 2

Exceso de fenol = D.O. a 260 nm / D.O. a 280 nm = ó > 2

Síntesis de ADNc (transcripción reversa).

La transcripción reversa es una reacción que consiste en la síntesis de ADN monocatenario o complementario (ADNc) a partir de moléculas de ARN monocatenario catalizada por la enzima transcriptasa reversa. Para llevar a cabo esta reacción se utilizaron alrededor de 100 ng de ARN de cada muestra así como el kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Síntesis Kit (Roche), siguiendo las intrusiones del proveedor.

La transcripción reversa se realizó en 2 fases:

Fase 1. Linearización de los ARN's y alineación de indicadores. Preparación de la mezcla maestra.

- a) 2 µl de iniciadores de la Transcripción de Deoxitimina (oligoDT)
- b) 3 µl de agua grado PCR
- c) 8 µl de la muestra de RNA

Se mantuvo 10 minutos a 65° y posteriormente se colocó en hielo a 4°C y se procedió a la fase 2.

Fase 2

- a) 4 µl de solución amortiguadora para la reacción de la Transcriptasa Reversa.
- b) 0.5 µl de inhibidor de ARNsas
- c) 2 µl de Desoxirribonucleótidos [10nM]
- d) 0.05 µl de Enzima Transcriptasa Reversa

En esta fase se realizó la transcripción reversa con el siguiente programa de termociclador: 37°C – 30 min, 45°C – 30 min, 85°C – 15 min.

V.8 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Q-PCR) (Q-RT-PCR).

Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer").

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación del genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que quiere amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

El PCR en tiempo real fue usado para medir los niveles de mRNA de los diferentes genes, en las diferentes muestras usando sondas tipo Taqman para

expresión genética (marcado con 6- carboxifluoresceína: FAN). Las reacciones de PCR se realizaron en 20 µL empleando el equipo Lightcycler 2.0 y el kit “Lightcycler Taqman Master”, siguiendo las instrucciones del proveedor (Roche):

- a) 4 µL de mezcla Lightcycler Taqman Master,
- b) 0.2 µL Uracil-DNA Glycosylase (2U/ µL),
- c) 0.2 µL de cebadores 0.4 nM cada,
- d) 4 µL of cDNA (50-500ng),
- e) 0.2 µL de la sonda (20 mM).

En el Lightcycler 1.5 se llevaron a cabo las reacciones con el siguiente programa: 10 min a 95°C para activar DNA polimerasa, la amplificación se realizó con 45 repeticiones de los dos pasos siguientes: 15 seg de desnaturalización a 95°C y un paso de 35 seg de alineación y extensión a 60°C (Tabla 7).

Tabla 7. Indicadores para la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (PCR-RT).

Gen/Código	UPL Probe #	Indicador de avances 5'-3'	T _m	Indicador de reversa 3'-5'	T _m
MYC/ 04689003001	77	cctagtgcctcatgaggaga	59	tccacagacaccacatcaattt	60
GIs/ 04688961001	73	aaggcagtctggagggaagg	59	acaccccacaaatcaggact	59
Glud1/ 04688996001	76	gggaggtcatcgaaggctac	60	tcagtgcctgtaacggatacctc	59
Glul (GS)/ 04687647001	31	ctcgctctcctgacctgttc	60	ttcaagtgggaacttgctga	59

Síntesis de cDNA

PCR en tiempo real: qPCR (real time PCR)

Variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y cuantificar de forma absoluta el producto de amplificación del ADN. Se utiliza un molde de ADN, un par de cebadores específicos (dNTPs), un tapón de reacción adecuado, y una ADN, polimerasa termoestable, a la que se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que, en un termociclador con sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a una longitud de onda apropiada, mide la tasa de generación de uno o más productos específicos. ⁽⁶¹⁾ La medición se realiza luego de cada ciclo de amplificación por esto denominado PCR en tiempo real (es decir, PCR inmediata, simultánea). El molde que se emplea no es desde el principio ADN, sino ADN complementario (ADNc), de hebra simple, obtenido por retrotranscripción de ácido ribonucleico (ARN), en este caso, la técnica es una RT-PCR cuantitativa en tiempo real, o RT-Q-PCR.

Fundamento

La PCR cuantitativa se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado. El termociclador calienta y enfría rápidamente las muestras rápidamente, de modo que se aprovechan las cualidades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos y las enzimas el amplicón del ADN polimerasa.

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de cambios de temperaturas que se repiten en 25-40 veces, llamados *ciclos*, donde cada uno posee un mínimo de tres etapas: 1) en torno a los 95°C, permite la separación de los ácidos nucleicos de doble cadena; 2) a una temperatura en torno a los 50-60°C, permite el

alineamiento de los cebdores al ADN molde, 3) a 68-72°C, facilita la polimerización de la ADN polimerasa ⁽⁶²⁾.

Técnica basada en sondas específicas utilizan al menos un oligonucleótido marcado fluorescentemente. Esta sonda está unida a dos fluorocromos e hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse).

Cuantificación relativa de la expresión génica

Se expresa el cambio en los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm), es la cuantificación más fácil de realizar, puesto que no requiere curva de calibrado, y se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar versus un gen control (también llamado de referencia, interno o normalizador o, en inglés, *housekeeping gene*) ⁽⁶³⁾.

PCR en tiempo real permite cuantificar el nivel de producto obtenido en cualquier momento de la amplificación mediante la señal de fluorescencia.

Las sondas TaqMan permiten medir la producción de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos. Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 3' y una molécula en el 5' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés quencher); esta sonda marcada híbrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos) en el amplicón emitirá o no fluorescencia, que está relacionado con la cantidad de amplicón producido ⁽⁶⁴⁾ (Figura 15).



Figura 15. Secuencia de PCR. Determinación de corticosterona plasmática por el método de ELISA.

V.9 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ELISA

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro ⁽⁶⁵⁾.

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

- Anticuerpos marcados:
 - ELISA Directo
 - ELISA Indirecto
 - ELISA sándwich
 - Doble (DAS)
 - Heterólogo (HADAS)

- Antígeno marcado:

- ELISA competitivo

Para la determinación de corticosterona plasmática, se utilizó el siguiente equipo reactivo: Corticosterone EIA Kit. Catalog No. ADI-901-097. 480 Well (5 x 96 Well) Kit.

DESCRIPCIÓN

El kit de inmunoensayo enzimático corticosterona (EIA) es un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa de corticosterona en los fluidos biológicos. El kit utiliza un anticuerpo policlonal de corticosterona para unirse, de una manera competitiva, la corticosterona en el patrón o la muestra o una molécula de fosfatasa alcalina que tiene corticosterona unido covalentemente a él. Después de una incubación simultánea a temperatura ambiente los reactivos en exceso se eliminan por lavado y se añade el sustrato. Después de un corto tiempo de incubación se detiene la reacción de la enzima y el color amarillo generado se leyó en un lector de microplacas a 405 nm. La intensidad del color amarillo unido es inversamente proporcional a la concentración de corticosterona en cualquiera de los estándares o muestras. La densidad óptica medida se utiliza para calcular la concentración de corticosterona. Para una explicación más detallada de los principios y la práctica de los inmunoensayos, vea los libros de Chard ⁽⁶⁶⁾ o Tijssen ⁽⁶⁷⁾.

INTRODUCCIÓN

La corticosterona (también referido como Compuesto B de Kendall y Reichstein sustancia B) es un glucocorticoide secretado por la corteza de la glándula suprarrenal.

La corticosterona se produce en respuesta a la estimulación de la corteza suprarrenal por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y es el precursor de la aldosterona. Corticosterona es un indicador importante de estrés o tensión. Los estudios que implican aumento en los niveles de corticosterona, hormona del estrés incluyen el deterioro de la memoria a largo plazo ⁽⁶⁸⁾, elevación crónica de corticosterona debido a restricción dietética ⁽⁶⁹⁾ y en respuesta a quemaduras ⁽⁷⁰⁾. Además de los niveles de estrés, se cree que la corticosterona desempeña un papel decisivo en el patrón de sueño-vigilia ^(71,72) (Figura 16).

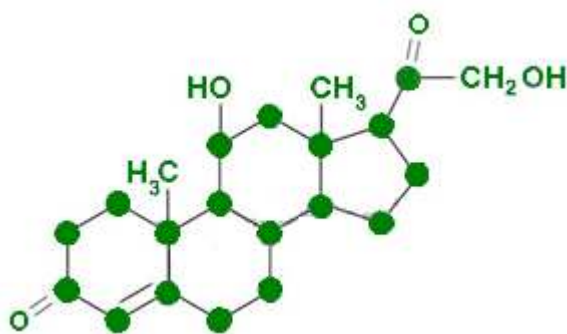


Figura 16. Estructura de la corticosterona

PROCEDIMIENTO

1. Añadir suficiente corticosterona a una muestra típica para la determinación de la eficiencia de la extracción.
2. En una campana de extracción, añadir 1 ml de acetato de etilo por cada ml de muestra. Tapar y agitar la muestra.
3. Permitir que las capas se separen. Pipetear con cuidado la capa orgánica superior y colocar en un tubo de ensayo limpio.
4. Repetir los pasos 1 y 2 dos veces más, la combinación de las capas orgánicas.

5. Se evapora el acetato de etilo a sequedad bajo nitrógeno.
6. Disolver la corticosterona se extrajo con al menos 250 l de tampón de ensayo 15. Vortex y luego dejar reposar durante cinco minutos a temperatura ambiente. Repita dos veces más.
7. Ejecutar las muestras reconstituidas en el ensayo inmediatamente o mantener las muestras secas congeladas a -20°C en la desecación.

PROCEDIMIENTO

Mantener los reactivos a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos antes de la apertura. Todas las normas y las muestras deben procesarse por duplicado.

1. Pipetear 100 µL de diluyente estándar (tampón de ensayo 15 o medios de cultivo de tejidos) en los pozos NSB y Bo (0 pg / mL estándar).
2. Pipetear 100 µL de solución estándar del número # 1 a # 5 en los pozos indicados.
3. Pipetear 100 µL de las muestras en los pocillos indicados.
4. Pipetear 50 µL de tampón de ensayo 15 en los pozos NSB.
5. Pipetear 50 µL de Conjugado azul en cada pozo, excepto en los pozos de Actividad Total (TA) y Blanco.
6. Pipetear 50 µL de Anticuerpo amarillo en cada pozo, excepto en los pozos Blanco, TA y NSB.

NOTA: Cada pozo bien preparado debe ser de color Verde, excepto los pozos NSB que debe ser Azul. Los pozos en blanco y TA están vacíos en este momento y no tienen color.

7. Incubar la placa a temperatura ambiente en un agitador de placas durante 2 horas aproximadamente a 500 rpm. La placa puede estar cubierto con la placa de sellador proporcionado, si así se desea.
8. Vaciar el contenido de los pozos y lavar añadiendo 400 μ L de solución de lavado a cada pozo. Repita el lavado 2 veces más para un total de 3 lavados.
9. Después del último lavado, vaciar o aspirar los pozos y golpear firmemente la placa sobre una toalla de papel libre de pelusas para eliminar cualquier resto de solución de lavado.
10. Añadir 5 μ L de conjugado azul a los pozos TA.
11. Añadir 200 μ L de la solución de sustrato pNPP a cada pozo. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora sin agitación.
12. Añadir 50 μ L de solución de parada a cada pocillo. Esto detiene la reacción y la placa debe leerse inmediatamente.
13. El blanco del lector de placas contra los pozos blanco, leer la densidad óptica a 405 nm, preferiblemente con corrección de entre 570 y 590 nm. Si el lector de placa no es capaz de ser borrado en contra de los pozos blanco, restar manualmente la densidad óptica media de los pozos blancos de todas las lecturas.

V.10 Captura y procesamiento estadístico de datos

V.10.1 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm SD ($n = 6$). Los niveles de ARNm y de corticosterona fueron analizados por ANOVA en caso de ser paramétricos o en su

defecto por la prueba post-hoc de Holm-Sidak. Para todas las pruebas, $P < 0.05$ fue considerado significativo. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SigmaPlot Versión 11 (Systat Software Inc., San José California, USA.).

VI. RESULTADOS

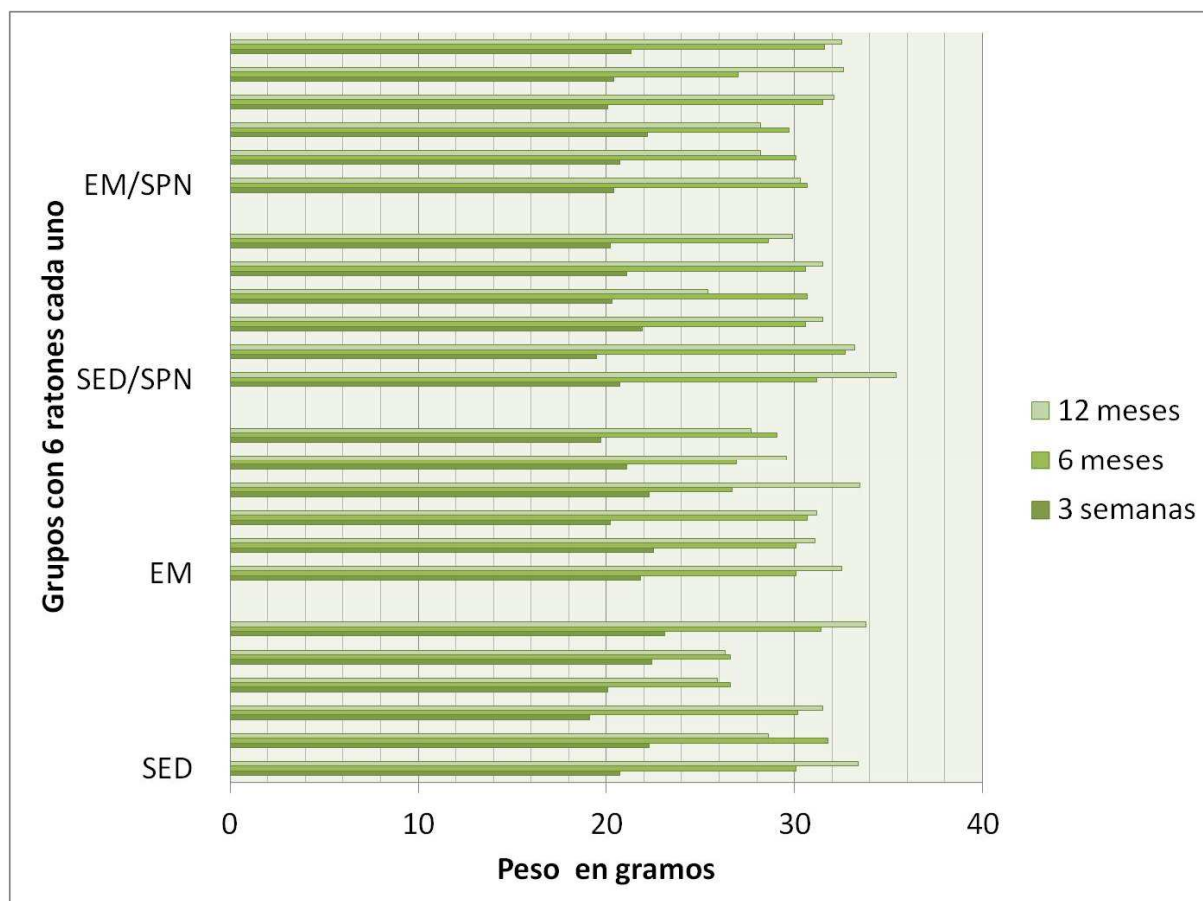
VI. RESULTADOS

VI.1 Peso de ratones con 12 meses de intervención

Durante los 12 meses en los que los ratones BALB/c estuvieron con diversas intervenciones, se observó que solo el 33.3% de los 24 ratones del ensayo estuvieron con miligramos menos de peso en el mes 12 en comparación con el peso del 6º mes. Se obtienen la media y desviación estándar, (Tabla 8, Gráfico 1).

Tabla 8. Media y desviación estándar del peso de ratones.

	3 semanas		6 meses		12 meses	
	<i>Media</i>	<i>Desviación</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación</i>
SED	21.283	1.555	29.45	2.305	29.917	3.483
EM	21.267	1.14	28.933	1.732	30.933	2.068
SED/SPN	20.617	0.826	30.733	1.317	31.15	3.38
EM/SPN	20.85	0.777	30.1	1.694	30.65	2.071



Gráfica 1. Peso de los ratones

VI.2 Extracción de RNA

La extracción de RNA se basó en la técnica de Trizol. Se realizó la extracción de RNA siguiendo los 3 pasos clásicos de ésta. (hogenización, precipitación y solubilización). Cada una de las muestras fueron cuantificadas espectrofotográficamente a una longitud de onda de 260nm y tenían una concentración de 0.4µg a 1.5 µg/µL. Estas muestras se sometieron a electroforesis horizontal en un gel de agarosa de 0.5%, figura 17. En la figura se observa en cada carril la integridad de 28s y 18s y relacionando esta integridad y cuantificación observada en el gel con la concentración obtenida por el espectrofotómetro (Figura 17).

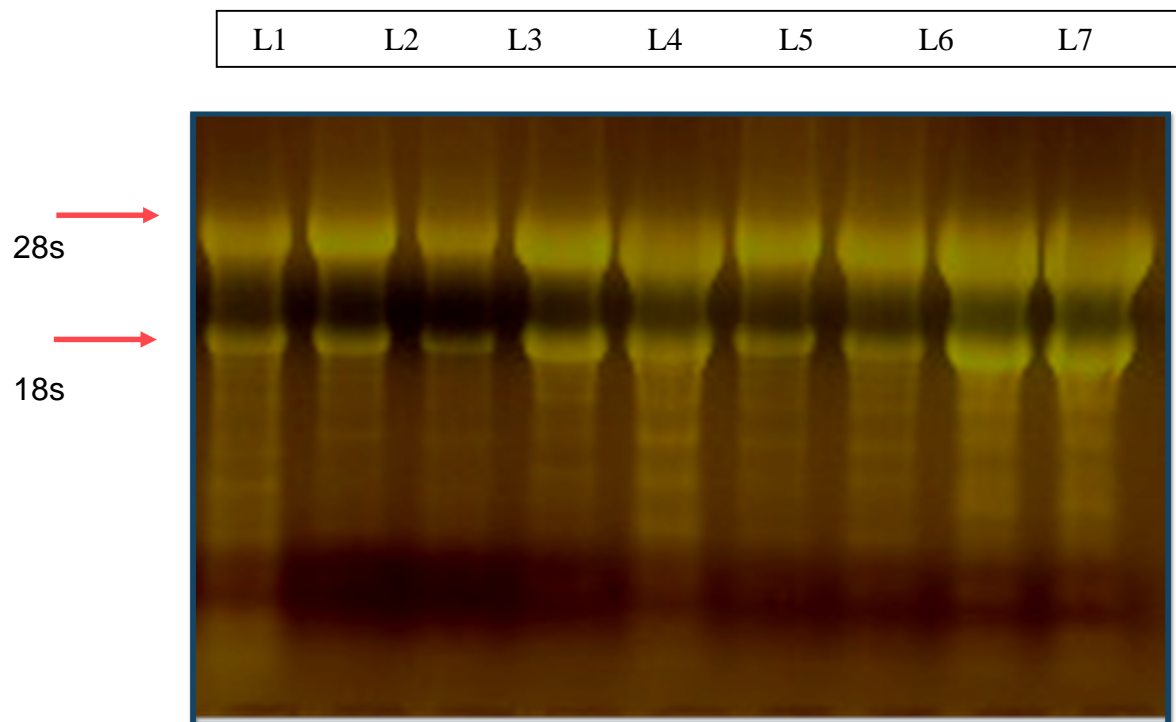


Figura 17. Electroforesis de RNA's en Gel de agarosa al 0.5%. La figura muestra integridad de RNA's, ribosómicos, (18s y 28s). En los carriles L1-L3 hay muestras de musculo esquelético de ratones control y en los carriles L4-L7 hay muestras de hígado de ratones control.

VI.3 Curva de rangos dinámicos

Una vez determinada la cuantificación e integridad de RNA, procedemos a síntesis de cDNA con el kit de Roche, esto se realizó previo al PCR en tiempo real. El PCR se realizó utilizando sondas tipo taqman, y previo a cada uno de ellos se realizó, una curva de rangos dinámicos, figura 16. Las muestras se diluyeron a diferentes concentraciones (0.1ng, 1ng, 10ng, 100ng, 500ng y 1000ng), y se procedió a realizar la curva de rangos dinámicos para determinar el rango de concentración con la mejor eficiencia de amplificación. Nosotros encontramos que la concentración más

adecuada es de 500ng con una eficiencia de amplificación muy cercana a 2 en todos los genes de interés (1.93-1.99) (Figura 18).

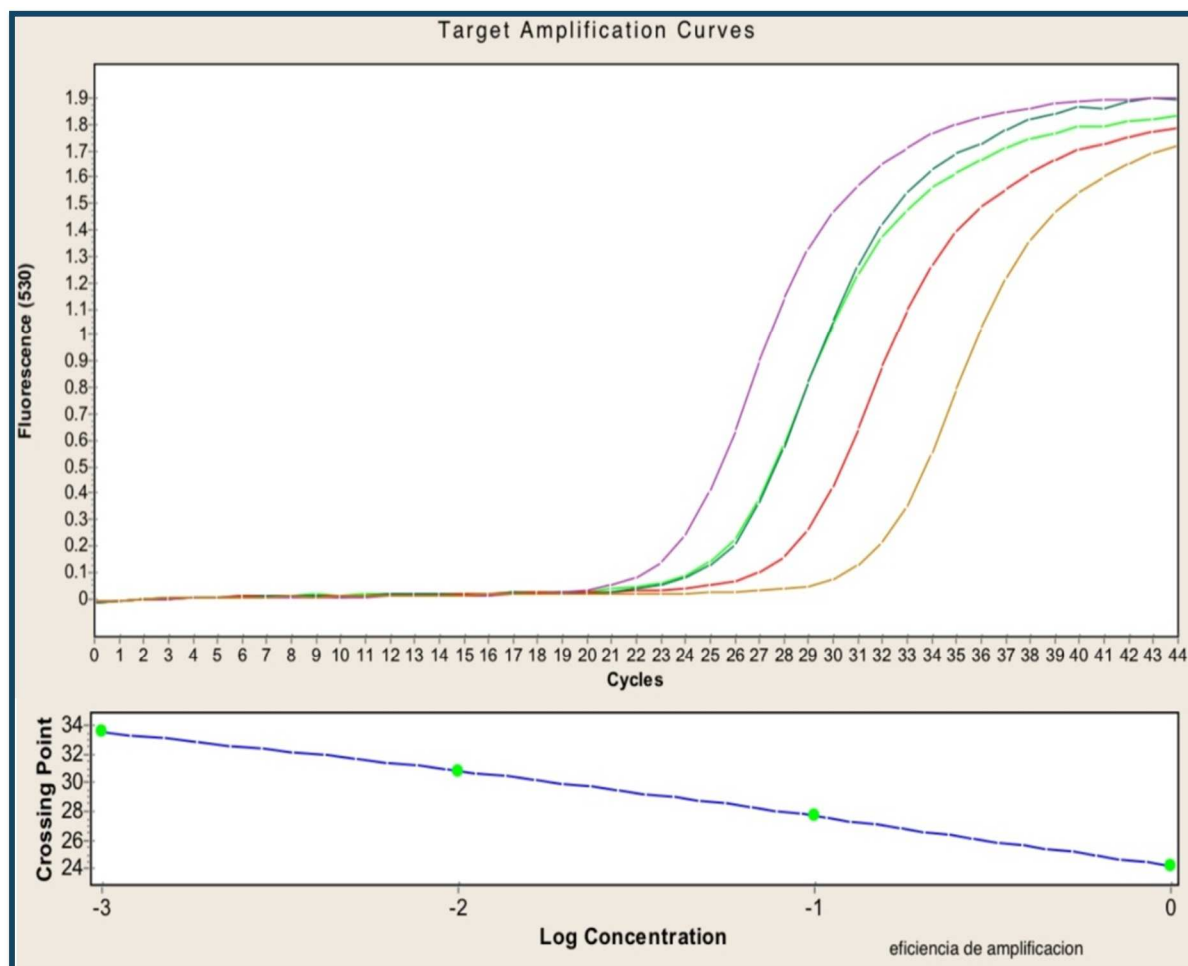


Figura 18. Curvas de rango dinámicas de PCR en tiempo real

VI.4 Amplicones

Todos los amplicones tuvieron una temperatura de alineación de 60°C, estos se sometieron a una electroforésis en un gel de agarosa al 2%, junto con un marcador de peso molecular para cada uno de ellos, (Figura 19).

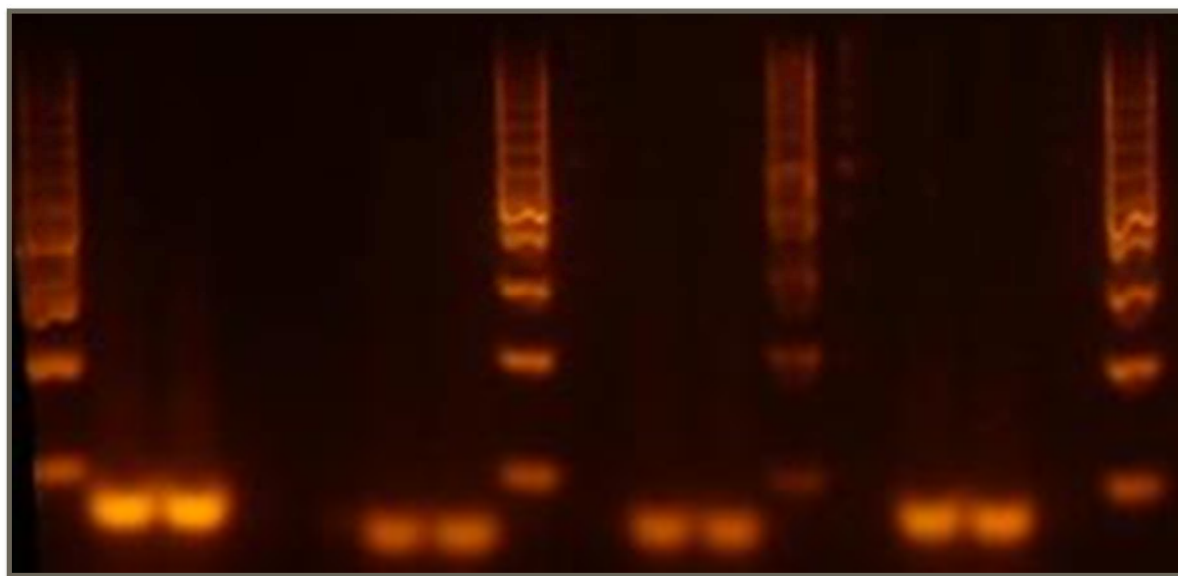


Figura 19. Amplicones en gel de agarosa. En la figura se aprecia en el carril número 1, el marcador de peso molecular que oscilaba entre 100-1500 pdb y se repite también en los carriles 8, 12, 17, el carril 2, 3 esta MYC, carril 6, 7 Gls, carril 10, 11 Glud1, en los carriles 14 y 15 Glul.

VI.5 Expresión relativa.

VI.5.1 Resultados del objetivo 1

De la vía catalítica de la glutamina la glutamina es hidrolizada a glutamato por la enzima glutamina sintetasa (Gls) y posteriormente por una segunda hidrólisis se degrada a **a**-cetoglutarato por la enzima glutamato deshidrogenasa (Glud1). La glutamina es sintetizada endógenamente del glutamato por la glutamina sintetasa (Gs).

La expresión de ARNm de Gls del grupo EM/SPN incrementa muy significativamente en músculo esquelético e hígado ($P < 0.001$) comparados con el

grupo control, pero también comparados con el grupo EM, en músculo ($P<0.05$) e hígado ($P<0.01$). Mientras que comparado con el grupo SED/SPN en músculo incrementó ($P<0.01$) e hígado ($P<0.001$). (Tabla 9, Gráfico 2).

Tabla 9. Media y desviación estándar del gen Gls en músculo esquelético e hígado.

	Músculo			Hígado	
	<i>Media</i>	<i>SD</i>		<i>Media</i>	<i>SD</i>
SED	1.2263	0.704		0.9264	0.383
EM	2.175	0.8247		2.07	0.8561
SED/SPN	1.88	1.175		1.514	0.824
EM/SPN	4.663	2.35		7.19	3.119

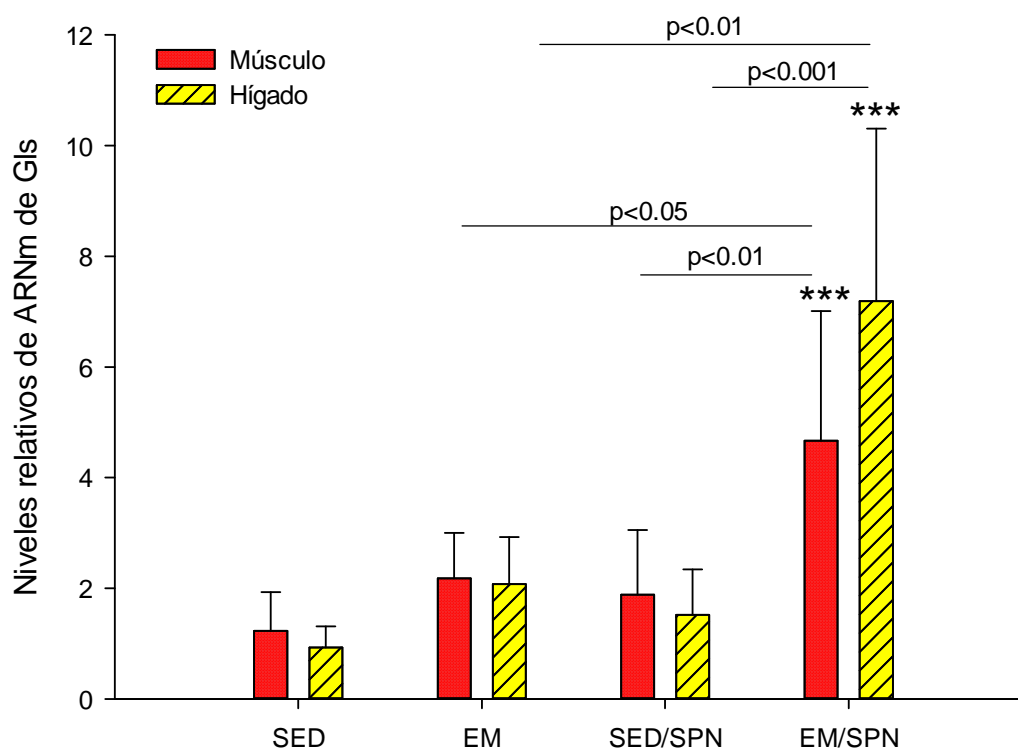


Gráfico 2. Expresión relativa del ARNm de Gls: En ratones sedentarios (SED), con ejercicio moderado (EM), con y sin sesión de nado extenuante. Los valores representan la media \pm desviación estándar del grupo de 6 ratones, considerando que *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ comparado con el grupo sedentario de los tejidos respectivos.

En la expresión de ARNm de Glud1, el grupo EM/SPN al compararlo con el grupo control, incrementan tanto músculo esquelético como hígado significativamente ($P < 0.001$). Entre grupos, EM/SPN incrementa músculo e hígado ($P < 0.001$) comparado con el grupo EM y SED/SPN (Tabla 10, Gráfico 3).

Tabla 10. Media y desviación estándar del gen Glud 1 en músculo esquelético e hígado.

	Músculo			Hígado	
	<i>Media</i>	<i>SD</i>		<i>Media</i>	<i>SD</i>
SED	1.055	0.681		1.389	0.892
EM	1.246	0.32		2.1995	0.696
SED/SPN	1.3853	0.286		1.104	0.371
EM/SPN	7.573	2.158		11.544	3.477

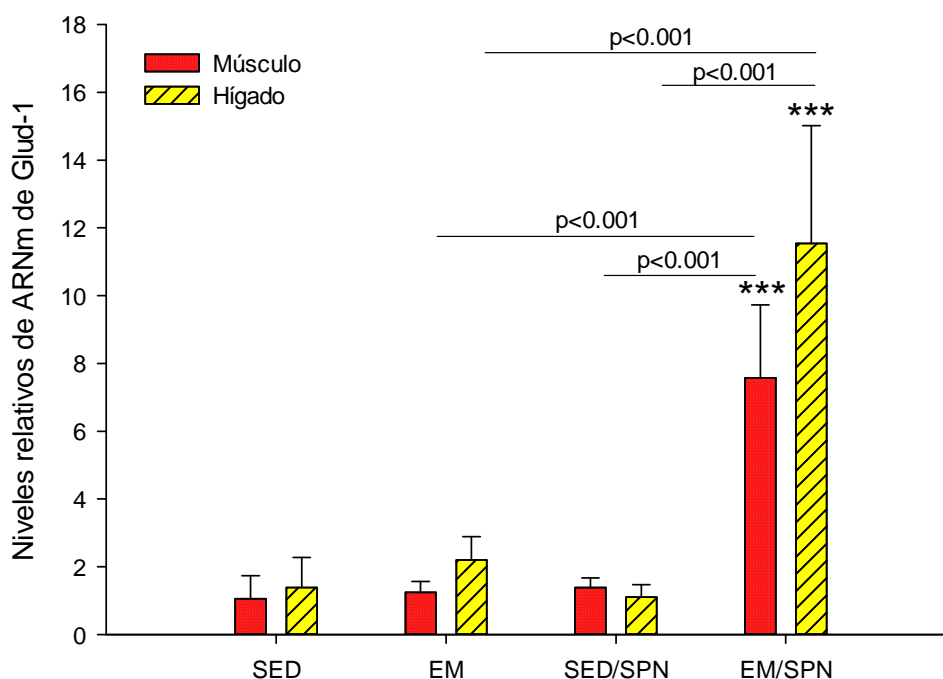


Gráfico 3. Expresión relativa del ARNm de Glud 1 en ratones sedentarios (SED), con ejercicio moderado (EM), con y sin sesión de nado extenuante. Los valores representan la media \pm desviación estándar del grupo de 6 ratones, considerando que *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ comparado con el grupo sedentario de los tejidos respectivos.

En la expresión de ARNm de Gs en hígado del grupo SED/SPN se observa incremento muy significativo ($P<0.001$) en comparación con el grupo control, además de incremento significativo ($P<0.01$) en músculo esquelético y de ($P<0.5$) en hígado del grupo EM/SPN. Entre grupos, la expresión de ARNm de músculo esquelético entre el grupo EM con el grupo SED/SPN aumenta ($P<0.01$), con EM/SPN no es tan significativo ($P<0.05$); en hígado la expresión en el grupo SED/SPN incrementa significativamente ($P<0.01$) en comparación con EM. Entre los grupos con y sin previo entrenamiento de ejercicio, el grupo (SED/SPN) incrementa la expresión ($p<0.05$) comparado con el del grupo EM/SPN. (Tabla 11, Gráfico 4)

Tabla 11. Media y desviación estándar del gen Gs en músculo esquelético e hígado.

	Músculo			Hígado	
	<i>Media</i>	<i>DS</i>		<i>Media</i>	<i>DS</i>
SED	1.04	0.423		0.98	0.4
EM	0.9384	0.387		1.954	0.592
SED/SPN	5.231	1.827		8.65	2.897
EM/SPN	2.851	1.701		4.05	1.957

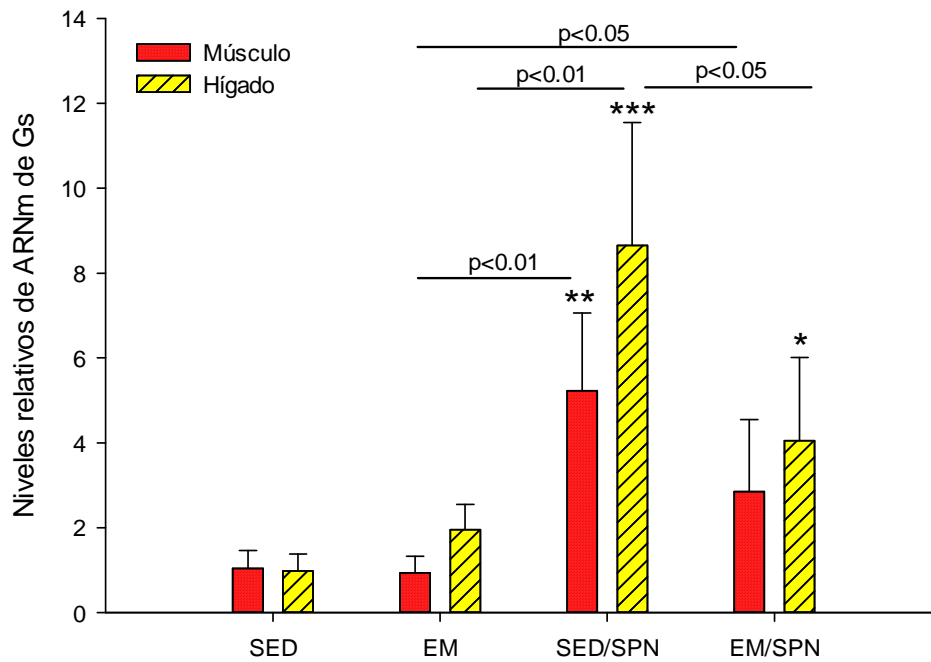


Gráfico 4. Expresión relativa del ARNm de Gs: en ratones sedentarios (SED), con ejercicio moderado (EM), con y sin sesión de nado extenuante. Los valores representan la media \pm desviación estándar del grupo de 6 ratones, considerando que *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ comparado con el grupo sedentario de los tejidos respectivos.

VI.5.2 Resultados del objetivo 2

En músculo esquelético e hígado, la expresión del ARNm de Myc en el grupo SED/SPN fue importantemente significativo ($P < 0.001$) comparado con el grupo control (SED), mientras que en el grupo EM la expresión en músculo fue más significativo ($P < 0.001$) que en hígado ($P < 0.05$). Entre los grupos con y sin previo ejercicio moderado de entrenamiento, existe un incremento significativo de la expresión de ARNm de Myc en el músculo esquelético del grupo SED/SPN. Comparando al grupo SED/SPN con el EM en hígado aumentó significativamente ($P < 0.01$) la expresión, mientras que en músculo esquelético aumentó la expresión en el grupo EM comparado con el grupo EM/SPN. (Tabla 12, Gráfico 5).

Tabla 12. Media y desviación estándar del gen Myc en músculo esquelético e hígado.

	Músculo			Hígado	
	<i>Media</i>	<i>DS</i>		<i>Media</i>	<i>DS</i>
SED	1	0.26		1	0.509
EM	4.164	1.04		1.9	0.871
SED/SPN	5.386	1.65		4.5688	1.815
EM/SPN	1.616	0.9414		2.408	1.791

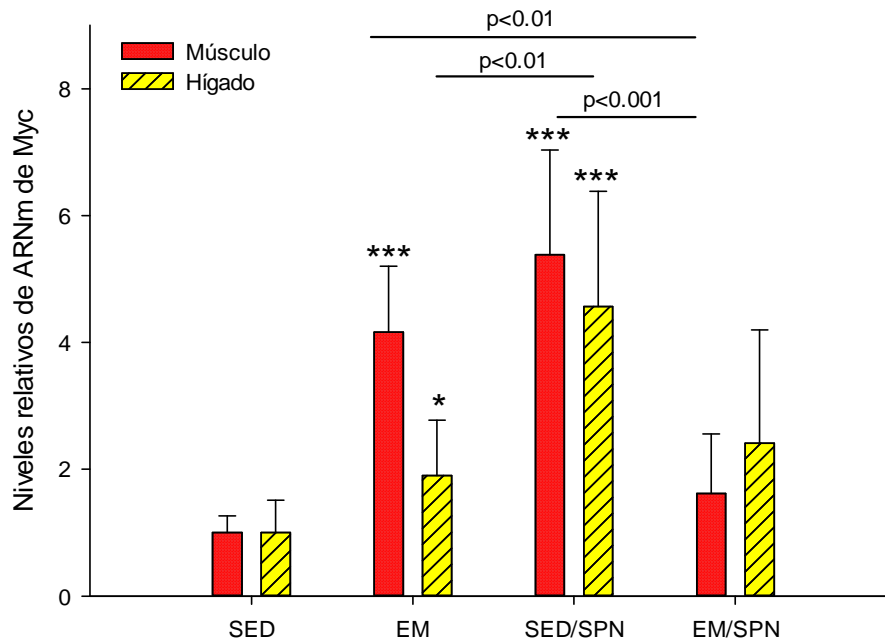


Gráfico 5. Expresión relativa del ARNm de Myc en ratones sedentarios (SED), con ejercicio moderado (EM), con y sin sesión de nado extenuante. Los valores representan la media \pm desviación estándar del grupo de 6 ratones, considerando que *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ comparado con el grupo sedentario de los tejidos respectivos.

VI.6 Cuantificación de proteínas

Se realizó la cuantificación de las proteínas de suero con el método de Bradford para igualar las concentraciones de la muestra al determinar los niveles de corticosterona. El primer paso en la determinación fue la elaboración de la curva estándar con albumina bovina (Sigma) (Grafico 6).

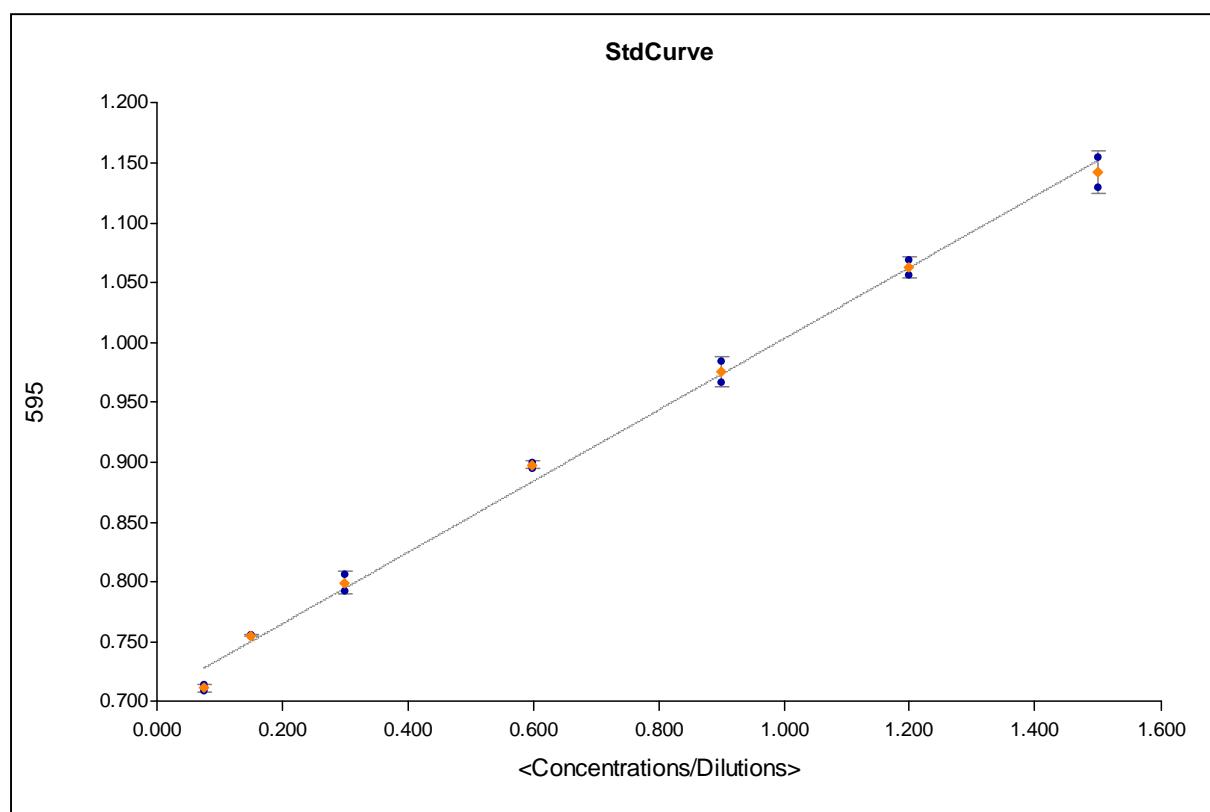


Gráfico 6. Curva estándar de albumina. La curva consistió en 7 diluciones diferentes de albumina con una correlación de 0.996

VI.7 Determinación de corticosterona

Curva estándar de Corticosterona

Se llevó a cabo la estandarización de la curva de Corticosterona con diferentes concentraciones (Tabla 13).

Tabla 13. Tabla para cálculo de resultados de Corticosterona

Muestra	Media DO (-Blanco)	Promedio DO	% Ligado	Costicosterona
Blanco DO	0.087			
TA	0.263			
NSB	0.087	0.000	0.0	
Bo	0.761	0.674	100	0
S1	0.176	0.089	13.2	20,000
S2	0.258	0.171	25.4	4,000
S3	0.400	0.313	46.4	800
S4	0.558	0.471	69.9	160
S5	0.667	0.580	86.1	32
Problema 1	0.639	0.552	81.9	54
Problema 2	0.460	0.372	55.2	445

Curva estándar de calibración de Corticosterona. (Tabla 14, Gráfico 7).

Tabla 14. Resultados para trazar la curva estándar de Corticosterona

curva	pg/ml	X ABS
ST1	20000	0.146
ST2	4000	0.278
ST3	800	0.469
ST4	160	0.701
ST5	32	0.774

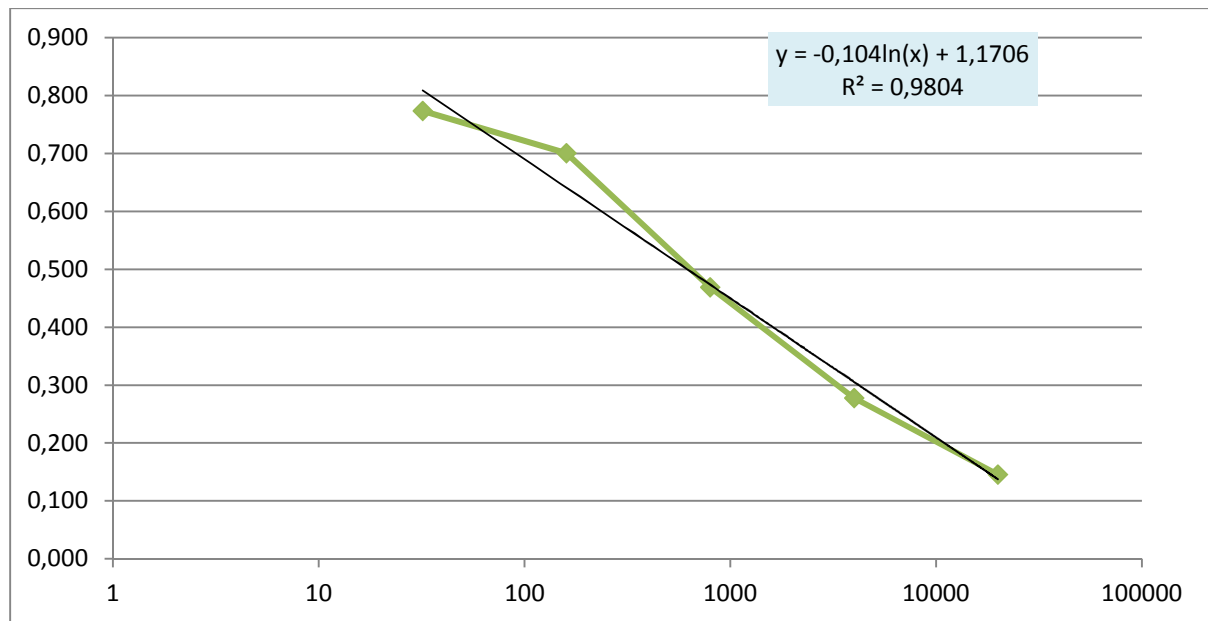


Gráfico 7. Curva estándar de corticosterona.

VI.5.2 Resultados del objetivo 3

En el grupo SED/SPN el nivel de corticosterona plasmática aumentó muy significativamente ($P < 0.001$), así como en el grupo EM/SPN ($P < 0.01$) comparados con el grupo control SED. Mientras que el grupo SED/SPN incrementó los niveles muy significativamente ($P < 0.001$) comparado con el grupo EM y con ($P < 0.01$) con el grupo EM/SPN Gráfico 5, (Tabla 15, Gráfico 8).

Tabla 15. Media y desviación estándar de Corticosterona plasmática

	<i>Media</i>	<i>DS</i>
SED	34558.958	15473.428
EM	31333.596	16603.881
SED/SPN	97756.96	16164.7
EM/SPN	57558.556	31416.18

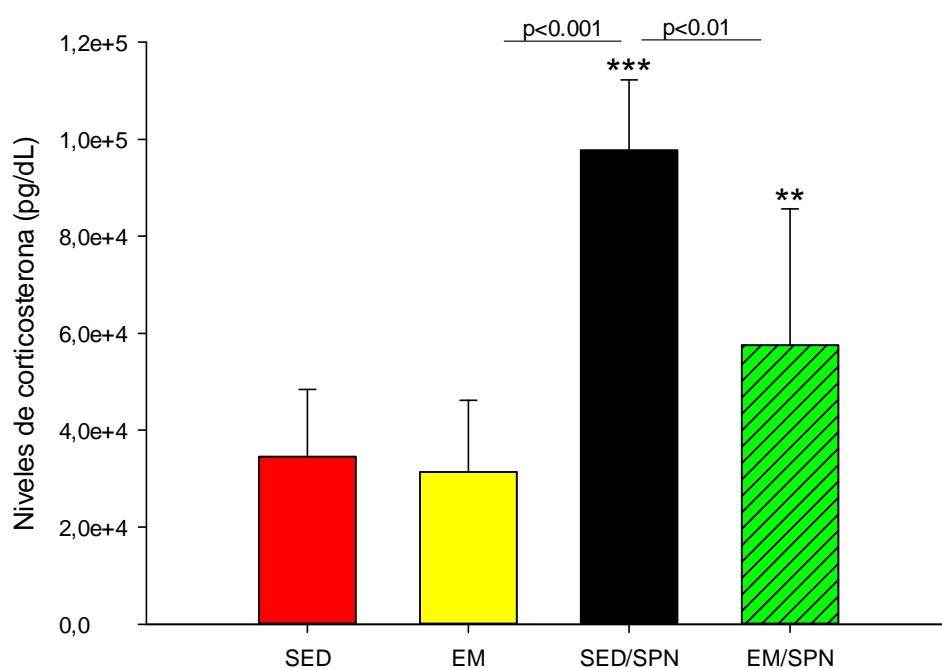


Gráfico 8. Niveles plasmáticos de corticosterona

VII. DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

Ejercicio prologando y periodos de sobreentrenamiento están asociados con disminución en la concentración plasmática de glutamina y esto se ha asociado a su vez a una inmunodepresión del sistema inmunitario lo cual incrementa, la susceptibilidad a las infecciones en los atletas.

Nuestros datos en conjunto muestran que el grupo de EM en comparación con el grupo SED, no mostró diferencias estadísticas significativas en la expresión de los genes Gls, Glud 1 y Gs, así como en los niveles plasmáticos de corticosterona evaluados. En cambio, en cuanto a la expresión del gen Myc para el grupo de EM, sí encontramos un incremento significativo en músculo ($P < 0.001$) e hígado ($P < 0.5$) respecto al grupo SED. Datos que sugieren que el estímulo del ejercicio moderado no tiene efecto sobre los niveles de transcripción de Gls, Glud 1, Gs y en cambio, sí tiene efecto sobre los trascritos de Myc. Evidencia ha demostrado en células de glioma y fibroblastos embrionarios de ratón transfectados con el gen Myc, que éste promueve la inducción constitutiva de la expresión de Myc, lo que resulta en la inducción de transportadores de glutamina, glutaminasa y lactato deshidrogenasa-A (LDH-A). Sin embargo el incremento en el ingreso de glutamina mostró que la incorporación de la glutamina así como su metabolismo, excede el uso de las células para la biosíntesis de proteínas y nucleótidos ⁽⁷³⁾, debido a que la mayoría del carbón ingresado de la glutamina después de la inducción de Myc, fue secretado como lactato ⁽⁵⁸⁾. Este mecanismo previamente demostró que la inducción de LDH-A por Myc es requerida para la transformación de Myc. Sin embargo, a niveles bajos de expresión, Myc induce incremento en la síntesis de proteína, en el crecimiento celular así como el la incorporación de glutamina en nuevas proteínas recién sintetizadas ^(74,75). Está plenamente establecido que la glutamina se metaboliza a glutamato para su posterior

entrada al ciclo de Krebs en la forma de alfa-cetoglutarato, así como las enzimas involucradas, glutaminasa (Gls) y Glutamato deshidrogenasa 1 (Glud 1) respectivamente ⁽⁷⁶⁾. Solo los grupos EM y el SED/SPN que incrementaron sus niveles de expresión de Myc tanto en músculo como en hígado. Previos estudios han demostrado que el ajuste promovido por el entrenamiento aeróbico induce cambios en la liberación de aminoácidos del músculo esquelético durante la contracción muscular causada por estimulación eléctrica ⁽⁷⁷⁾.

Dentro de los mecanismos por los cuales la concentración de glutamina en plasma disminuye durante el ejercicio físico citaremos tres hipótesis que se han postulado: I) la disminución en la concentración plasmática de la glutamina ocurre debido a la alta demanda del riñón y el hígado para la síntesis de glucosa, acompañado por un incremento en la tasa de utilización de glutamina por otros tipos celulares, como el sistema inmunitario ^(78,79); II) durante condiciones exhaustivas, la tasa de liberación de glutamina liberada de los músculos se deteriora, lo que resulta en una disminución de la concentración de glutamina en plasma ⁽⁷⁹⁾ y III) el ejercicio exhaustivo disminuye la síntesis de glutamina en el músculo esquelético ⁽⁸⁰⁾.

La glutamina sintetasa (Gs) es una enzima que cataliza la condensación dependiente de ATP de glutamato y amonio para formar glutamina ⁽⁸¹⁾. El entrenamiento de intensidad puede a su vez atenuar el usual incremento en la expresión de Gs durante condiciones catabólicas ^(82,83). En contraste escasa información existe sobre los cambios en la expresión de la enzima después del entrenamiento, así como no son claros los efectos del ejercicio agudos en la actividad de Gs ⁽⁸¹⁾. Al igual que los hallazgos de Dos Santos et al. (2009) ⁽⁸⁰⁾, en nuestros grupos con ejercicio extenuante sugieren que el aumento en la expresión de Gs puede estar asociado con una estimulación en la concentración de amonio, un importante

substrato para la síntesis de glutamina. Los mismos autores, al igual que otros, han sugerido que el incremento en la actividad de Gs en conjunto con la disminución de la concentración de la glutamina plasmática, puede indicar incremento en el consumo de la glutamina en otros tejidos como el hígado, riñones y sistema inmunitario (80,84,85,86).

Aunque el músculo esquelético es el principal sitio de almacén y producción de glutamina y aunque ésta da cuenta al menos del 50% del total de pool de amino ácidos, la glutamina libre no es suficiente para satisfacer la cantidad total de la glutamina liberada durante una elevada demanda ⁽⁸⁷⁾.

Se ha demostrado que durante y después del ejercicio, la interacción entre bioquímica y cambios hormonales, pueden modular la síntesis de glutamina porque durante el ejercicio, un incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis promueve un incremento transitorio en la concentración de glutamina en plasma (88,89,90).

Durante condiciones de estrés, la homeostasis de glutamina en el músculo esquelético es dependiente de tres factores: I) ingreso de glutamina en otros tejidos; II) la producción de glutamina y III) la liberación de glutamina debido a la degradación de las proteínas en el músculo ^(91,86,92). El proceso de liberación de glutamina del músculo esquelético es el flujo que genera el metabolismo de la glutamina en diversos órganos.

El análisis entre el grupo de ejercicio moderado vs ejercicio moderado con ejercicio extenuante, mostró un incremento en corticosterona, en los niveles de ARNm de Gs en músculo e hígado. Estos hallazgos sugieren que el ejercicio extenuante incrementa la secreción de corticosterona. Evidencia muestra que los glucocorticoides

incrementan la tasa de liberación de glutamina del músculo esquelético en varias especies incluida la humana ⁽⁹³⁾

Por otro lado, el aumento de los niveles de ARNm de Glis y de Glud1 podrían responder a un incremento de la vida media de estos transcritos favorecido un mecanismo post-transcripcional descritos en fases de acidosis celular, en este sentido proteínas sensibles a pH regulan la vida media y degradación de Glis y Glud. Estos hallazgos sugieren que la sesión de nado prolongado (SPN) tiene profundo efecto sobre los transcritos Glis, Glud y Gs, así como en los niveles de corticosterona quizás, reduciendo los niveles plasmáticos glutamina en el tejido muscular, así como la activación del eje hipotálamo-hipófisis mediado por la corticosterona la cual, tiene diferente efecto sobre la transcripción de Gs en el músculo y el hígado. Estudios en el músculo soleo han demostrado que los glucocorticoides estimulan las fibras musculares blancas y rojas de forma diferente, así como la liberación de glutamina ⁽⁹⁴⁾.

El estrés intenso durante el ejercicio moderado (EM), pone de manifiesto un papel importante en el catabolismo y en el suministro de glutamina, a través de su catabolismo (Glis y Glud), para proveer el suministro de energía y biomoléculas necesarias para mantener la viabilidad celular en órganos vitales como riñones, encéfalo, hígado, células inmunitarias ⁽⁹⁵⁾, proliferación de mucosas y células de médula ósea. La disminución en la expresión de Myc en conjunción, con el aumento en el nivel de corticosterona, son mecanismos que promoverían un medio de transporte de nitrógeno y a la par, donadores de proteínas, así como eventos importantes en la regulación ácido base, gluconeogénesis y como precursor de bases nitrogenadas y el antioxidante glutathione ⁽¹⁸⁾.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

Una vez expuestos los resultados y discutidos los mismos, hemos llegado a las siguientes conclusiones

1. El ejercicio moderado compensa la expresión de los genes Glu, Glud, Gs y Myc, debido a que los órganos de la economía, regulan sus necesidades de biosíntesis de macromoléculas a partir de la glutamina circulante manteniendo la homeostasis.
2. El ejercicio extenuante con y sin acondicionamiento físico aumenta la concentración de corticosterona la cual, está debidamente demostrado que incrementa la expresión del gen Gs, pero en nuestro estudio, sólo el grupo de ejercicio extenuante sin entrenamiento aumentó mayormente la expresión de Gs en hígado, evento que apoyaría la síntesis de glucógeno en hígado.
3. El ejercicio extenuante sin acondicionamiento incrementa el ARNm del gene Gs importante en la detoxificación de amonio por el riñón, así como el flujo continuo de glutamina a los órganos esenciales.
4. En nuestro estudio, los niveles de expresión de Glu y Glud en el grupo con acondicionamiento físico previo, durante el ejercicio extenuante, el grupo mantiene el aporte anaplerótico para la síntesis macromolecular (proteínas y bases nitrogenadas), lo contrasta de manera importante con el grupo sin entrenamiento físico.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks SV. Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *Adv Physiol.* 2003; 27:171-82.
2. Montalvo E. Sistema locomotor. *Biología celular e histología médica.* México. UNAM. 2011; pp. 1-31.
3. Verdijk L, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg H, Van Loon L. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292:E151–E157.
4. Kadi F, Charifi N, Henriksson J. The number of satellite cells in slow and fast fibres from human vastus lateralis muscle. *Histochem Cell Biol.* 2006; 126(1):83-7.
5. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?. *J Cell Biol.* 2004; 166(3):347-57.
6. Chicharro JL, Fernández A. *Fisiología del ejercicio.* (3º ed.) Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; Madrid. 2006
7. Fawcett DW. *Músculo estriado. Tratado de Histología.* Bloom Fawcett (12ª ed.). Editorial Mc Graw Hill Interamericana. Madrid. 1995
8. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. [homepage on the internet] Brasil. UNESP 2007: Fibras esqueléticas. Available from: <http://www.museuescola.ibb.unesp.br/subtopico.php?id=2&pag=2&num=3&sub=20#fibrasesqueleticas>
9. Morán Bermejo M. Tipos de fibras musculares. López Chicharro J, Fernández Vaquero A, editores. *Fisiología del Ejercicio.* 3ª ed. Madrid Ed. Panamericana. 2006

10. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. [homepage on the internet] Brasil. UNESP 2007: Fisiologia do Exercício I. Available from: <http://www.museuescola.ibb.unesp.br/subtopico.php?id=2&pag=2&num=3&sub=25>
11. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. [homepage on the internet] Brasil. UNESP 2007: Fisiologia do Exercício II. Available from: <http://www.museuescola.ibb.unesp.br/subtipo.php?id=2&pag=&num=3&sub=41>
12. Terjung RL. Adaptaciones musculares al entrenamiento aeróbico. PubliCE Standard. New York. Vol. 17. 1998.
<http://www.fecna.com/wp-content/uploads/2011/08/Adaptaciones-Musculares-al-entrenamiento-aer%C3%B3bico-Terjung.pdf>.
13. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011; 91(4):1447-1531.
14. Zhang L, Keung W, Samokhvalov V, Lopaschuk GD. Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801(1):1-22.
15. Newsholme P, Lima M, Procopio J, Pithon-Curi T, Doi S, Bazotte R, Curi R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36(2):153-63.
16. Bowtell JL, Bruce M. Glutamine: an anaplerotic precursor. *Nutrition.* 2002; 18(3): 222-4.
17. Matorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos G. Exercise and the stress system. *HORMONES.* 2008; 4(2):73-89.

18. Gleeson M. Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. *J Nutr.* 2008; 138(10):2045S-9S.
19. Krebs HA. Glutamine metabolism in the animal body. In: Mora J, Palacios J, editors. *Glutamine: metabolism, enzymology, and regulation.* New York: Academic Press. 1980; pp. 319-29.
20. Biolo G, Iscra F, Toigo G, Ciocchi B, Situlin R, Gullo A, Guarnieri G. Transmembrane transport and intracellular kinetics of amino acids in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1995; 268:E75–E84.
21. Nurjhan N, Bucci A, Perriello G, Stumvoll M, Dailey G, Bier DM, Toft I, Jenssen TG, Gerich JE. Glutamine: a major gluconeogenic precursor and vehicle for interorgan carbon transport in man. *J Clin Invest.* 1995; 95:272-7.
22. Kuhn KS, Schuhmann K, Stehle P, Darmaun D, Furst P. Determination of glutamine in muscle protein facilitates accurate assessment of proteolysis and de novo synthesis-derived endogenous glutamine production. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70:484-9
23. Biolo G, Iscra F, Toigo G, Ciocchi B, Situlin R, Gullo A, Guarnieri G. Effects of growth hormone administration on skeletal muscle glutamine metabolism in severely traumatized patients: preliminary report. *Clin Nutr.* 1997; 16:89-91.
24. Castell LM, Poortmans JR, Newsholme EA. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes?. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1996; 73:488-90.
25. Häussinger D, Schliess F. Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Front Biosci.* 2007; 12:371-91.

26. Castell L, Vance C, Abbott R, Márquez J, Eggleton P. Granule localization of glutaminasa in human neutrophils and the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity. *J Biol Chem.* 2004; 279:13305-10.
27. Medina MA, Nuñez de Castro I. Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. *Int J Biochem.* 1990; 22:6813.
28. Kovacevic Z, McGivan JD. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. *Physiol Rev.* 1983; 63:547-605.
29. Quesada AR, Sánchez-Jiménez F, Pérez-Rodríguez J, Márquez J, Medina MA, Núñez de Castro I. Purification of phosphate-dependent glutaminase from isolated mitochondria of Ehrlich ascites-tumour cells. *Biochem J.* 1988; 255:1031-6.
30. McKeehan WL. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Int Rep.* 1982; 6:635-50.
31. Moreadith RW, Lehninger AL. The pathway of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria. *J Biol Chem.* 1984; 259:6215-21.
32. McKeehan WL. Glutaminolysis in animal cells. In: Morgan MJ, editor. *Carbohydrate metabolism in cultured cells.* New York: Plenum Press. 1986; pp. 111-50.
33. Grahan TE, Maclean DA. Ammonia and amino acid metabolism in skeletal muscle: human, rodent and canine models. *Med Sci Sports Exerc.* 1998; 30:34-46.
34. Walsh NP, Blain AK, Clark AM, Robson PJ, Gleeson M. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organics acids. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1998; 77:434-8.

35. Castell LM. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and immunodepression. *Sports Med.* 2003; 33:323-45.
36. Castell, LM. *The Role of Some Amino Acids in Exercise, Fatigue and Immunodepression.* Oxford: University of Oxford, 1996.
37. Koyama K, Kaya M, Tsujita J. Effects of decreased plasma glutamine concentrations on peripheral lymphocyte proliferation in rats *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1998; 77:25-31.
38. Walsh NP, Blainin AK, Clark AM, Robson PJ, Gleeson M. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organics acids. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1998; 77:434-8.
39. Bassit R, Sawada LA., Bacurau RF, Navarro, F, Costa Rosa, LF. The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2000; 32:1214-9.
40. Bacurau RFP, Bassit R, Sawada LA, Navarro F, Costa Rosa, LF. Carbohydrate supplementation during intense exercise and the immune response in cyclists. *Clin Nutr.* 2002; 21:423-9.
41. Parry-Billings M, Budgett R, Koutedakis Y, Blomstrand E, Brooks S, Williams C, Newsholme EA. Plasma amino acid concentrations in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc.* 1992; 24: 1353-8.
42. Rowbottom DG, Keast D, Godlman C, Morton AR. The haematological, biochemical and immunological profile of athletes: suffering from the overtraining syndrome. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1995; 70:502-9.
43. De Berardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism

- that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2007; 104:19345-50.
44. McGivan JD, Bungard CI. The transport of glutamine into mammalian cells. *Front Biosci*. 2007; 12:874-82.
 45. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:6479-83.
 46. Eilers M and Eisenman N. Myc's broad reach. *Genes Dev*. 2008; 22: 2755-66.
 47. O'Connell BC, Cheung AF, Simkevich CP, Tam W, Ren X, Mateyak MK, Sedivy JM. A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated. *J Biol Chem*. 2003; 278(14):12563-73.
 48. Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Dang CV. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol*, 2005; 25(14):6225-34.
 49. Schlosser I, Hölzel M, Hoffmann R, Burtcher H, Kohlhuber F, Schuhmacher M, Eick D. Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene*. 2005; 24(3):520-4.
 50. Lawlor ER, Soucek L, Brown-Swigart L, Shchors K, Bialucha CU, Evan GI. Reversible kinetic analysis of Myc targets in vivo provides novel insights into Myc-mediated tumorigenesis. *Cancer Research*, 2006; 66(9):4591-601
 51. Patel JH, Du Y, Ard P, Phillips C, Carella B, Chen CJ, Rakowski C, Chatterjee Ch, Lieberman P, Carriel W, McMahon SB. The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol*. 2004; 24(24):10826-34.

52. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94(13):6658-63.
53. Morrish F, Giedt C, Hockenbery D. c-MYC apoptotic function is mediated by NRF-1 target genes. *Genes Dev.* 2003; 17(2):240-55.
54. Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang Ch, Semenza GL. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer cell.* 2007; 11(5):407-20.
55. Morrish F, Neretti N, Sedivy JM, Hockenbery DM. The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry. *Cell cycle.* 2008; 7(8):1054-66.
56. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:6479-83.
57. Dang CV. Rethinking the Warburg effect with Myc micromanaging glutamine metabolism. *Cancer Res.* 2010; 70:859-62.
58. Wise DR, De Berardinis RJ, Mancuso AS, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:18782-7.
59. Lara-Padilla E, Campos-Rodríguez R, Jarillo-Luna A, Reyna-Garfias H, Rivera-Aguilar V, Miliar A, Berral FJ, Navas P, López-Lluch G. Caloric restriction reduces IgA levels and modifies cytokine mRNA expression in mouse small intestine. *J Nutr Biochem.* 2011; 22(6):560-6.

60. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162(1):156-9.
61. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. *Molecular Biology of the Gene* (Six edition). San Francisco: Benjamin Cummings. 2008; pp. 880.
62. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro». *Nucl Acids Res.* 1990; 18:6409-12.
63. Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol*, 2004; 4:14.
64. Heid Ch, Stevens J, Livak K, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 1996; 6(10):986-94
65. Gibbs J, Maine K. "Immobilization Principles–Selecting the Surface." *ELISA Technical Bulletin*. 2001; 1:1-8.
66. Chard T. *An Introduction to Radioimmunoassay & Related Techniques* 4th ed. Elsevier. Amsterdam.1990.
67. Tijssen P. *Practice and theory of enzyme immunoassays*. Amsterdam. Elsevier. 1988; pp 549.
68. Hupe JM, James AC, Payne BR, Lomber SG, Girard P, Bullier J. Cortical feedback improves discrimination between figure and background by V1, V2 and V3 neurons. *Nature* 1998; 394:784-7.
69. Kitaysky AS, Kitaiskaia EV, Wingfield JC, Piatt JF. Dietary restriction causes chronic elevation of corticosterone and enhances stress response in red-legged kittiwake chicks. *J Comp Physiol B*. 2001; 171:701-9.

70. Thellin O, Noel G, Krurana S, Ogle CK, Horseman ND. Stress hormone secretion and gut signal transducer (sat) proteins after burn injury in rats. *Shock*. 2001; 16; 393-7.
71. Krame KM, Sothern RB. Circadian characteristics of corticosterone secretion in redbacked voles (*Clethrionomys gapper*). *Chronobiol. Int.* 2001; 18(6):933-45.
72. Vázquez-Palacios G, Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J. Further definition of the effect of corticosterone on the sleep-wake pattern in the male rat. *Pharmacol Biochem Behavior*. 2001; 70(2-3):305-10.
73. Chen MK, Espat NJ, Bland KI, Copeland EM, Souba WW. Influence of progressive tumor growth on glutamine metabolism in skeletal muscle and kidney. *Ann Surg*, 1993; 217(6):655-67.
74. Johnston LA, Prober DA, Edgar BA, Eisenman RN, Gallant P. *Drosophila myc* regulates cellular growth during development. *Cell*. 1999; 98(6):779-90.
75. Iritani BM, Eisenman RN. c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *P Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(23):13180-5.
76. Estevez-Garcia IO, Cordoba-Gonzalez V, Lara-Padilla E, Fuentes-Toledo A, Falfan-Valencia R, Campos-Rodriguez R, et al. Glucose and glutamine metabolism control by APC and SCF during the G1-to-S phase transition of the cell cycle. *J Physiol Biochem*. 2014; 70(2):569-81.
77. Hood DA, Terjung RL. Endurance training alters alanine and glutamine release from muscle during contractions. *FEBS Lett*. 1994; 340(3):287-90.
78. Costa Rosa LF, Cury Y, Curi R. Hormonal control of macrophage function and glutamine metabolism. *Biochem Cell Biol*. 1991; 69(4):309-12.

79. Santos RV, Caperuto EC, Costa Rosa LF. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci.* 2007; 80(6):573-8.
80. Dos Santos RV, Caperuto EC, de Mello MT, Batista ML, Jr., Rosa LF. Effect of exercise on glutamine synthesis and transport in skeletal muscle from rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009; 36(8):770-5.
81. Graham TE, MacLean DA. Ammonia and amino acid metabolism in skeletal muscle: human, rodent and canine models. *Med Sci Sports Exerc.* 1998; 30(1):34-46.
82. Falduto MT, Young AP, Smyrniotis G, Hickson RC. Reduction of glutamine synthetase mRNA in hypertrophied skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1992; 262(6):R1131-R6.
83. Dos Santos Cunha WD, Giampietro MV, De Souza DF, Vaisberg M, Seelaender MC, Rosa LF. Exercise restores immune cell function in energy-restricted rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36(12):2059-64.
84. Costa Rosa, Luis FBP. Exercise as a time-conditioning effector in chronic disease: a complementary treatment strategy. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2004; 1(1):63-70.
85. Newsholme EA. Biochemical control logic and the metabolism of glutamine. *Nutrition.* 1994; 10(2):178-9.
86. Parry-Billings M, Leighton B, Dimitriadis GD, Bond J, Newsholme EA. Effects of physiological and pathological levels of glucocorticoids on skeletal muscle glutamine metabolism in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1990; 40(5):1145-8.

87. Labow BI, Souba WW, Abcouwer SF. Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism--glutaminase and glutamine synthetase. *J Nutr*, 2001; 131(9):2467S-74S
88. Droste SK, Chandramohan Y, Hill LE, Linthorst AC, Reul JM. Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology*. 2007; 86(1):26-37.
89. Minetto MA, Lanfranco F, Baldi M, Termine A, Kuipers H, Ghigo E, et al. Corticotroph axis sensitivity after exercise: comparison between elite athletes and sedentary subjects. *J Endocrinol Invest*. 2007; 30(3):215-23.
90. Viru A, Viru M, Karelson K, Janson T, Siim K, Fischer K, et al. Adrenergic effects on adrenocortical cortisol response to incremental exercise to exhaustion. *Eur J Appl Physiol*. 2007; 100(2):241-5.
91. Newsholme EA, Calder PC. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. *Nutrition*. 1997; 13(7-8):728-30.
92. Minet-Quinard R, Moinard C, Villie F, Vasson MP, Cynober L. Metabolic pathways implicated in the kinetic impairment of muscle glutamine homeostasis in adult and old glucocorticoid-treated rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 287(4):E671-6.
93. Leighton B, Parry-Billings M, Dimitriadis G, Bond J, Newsholme EA, DaCosta C, et al. Physiological glucocorticoid levels regulate glutamine and insulin-mediated glucose metabolism in skeletal muscle of the rat. Studies with RU 486 (mifepristone). *Biochem J*. 1991; 274(Pt 1):187-92.

94. Wagenmakers AJ. Protein and amino acid metabolism in human muscle. *Adv Exp Med Biol.* 1998; 441:307-19.
95. Pithon-Curi TC, De Melo MP, Curi R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct.* 2004; 22(5):321-6

X. ANEXOS

ANEXO 1. Dieta Harlan NIH-31

Harlan Laboratories

NIH-31 Open Formula Mouse/Rat Sterilizable Diet

7017

Product Description- 7017 is a fixed and open formula, autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, growth, and maintenance of rodents. 7017 is supplemented with additional vitamins to ensure nutritional adequacy after autoclaving. Also available certified (7017C) and irradiated (7017I).

Ingredients (in descending order of inclusion)- Ground wheat, ground corn, ground oats, wheat middlings, fish meal, dehulled soybean meal, dehydrated alfalfa meal, corn gluten meal, soybean oil, dicalcium phosphate, brewers dried yeast, calcium carbonate, iodized salt, choline chloride, magnesium oxide, kaolin, ferrous sulfate, menadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), manganous oxide, thiamin mononitrate, niacin, calcium pantothenate, vitamin E acetate, vitamin A acetate, copper sulfate, zinc oxide, riboflavin, pyridoxine hydrochloride, vitamin B₁₂ supplement, vitamin D₃ supplement, calcium iodate, biotin, folic acid, cobalt carbonate.

Macronutrients		
Crude Protein	%	18.0
Fat (ether extract) ^a	%	4.7
Carbohydrate (available) ^b	%	46.5
Crude Fiber	%	4.0
Neutral Detergent Fiber ^c	%	13.6
Ash	%	6.2
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.0 (12.6)
Calories from Protein	%	24
Calories from Fat	%	14
Calories from Carbohydrate	%	62
Minerals		
Calcium	%	1.1
Phosphorus	%	1.0
Non-Phytate Phosphorus	%	0.7
Sodium	%	0.3
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.5
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	47
Manganese	mg/kg	155
Copper	mg/kg	13
Iodine	mg/kg	2
Iron	mg/kg	270
Selenium	mg/kg	0.30
Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.5
Glutamic Acid	%	3.2
Alanine	%	1.1
Glycine	%	1.0
Threonine	%	0.7
Proline	%	1.5
Serine	%	0.9
Leucine	%	1.4
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.8
Phenylalanine	%	0.8
Tyrosine	%	0.7
Methionine	%	0.4
Cystine	%	0.3
Lysine	%	0.8
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

Standard Product Form: Pellet		
Vitamins		
Vitamin A ^{e,f}	IU/g	24.2
Vitamin D ₃ ^{e,g}	IU/g	4.2
Vitamin E	IU/kg	41
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	22
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	76
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	7
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	87
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	9
Pantothenic Acid	mg/kg	39
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.06
Biotin	mg/kg	0.30
Folate	mg/kg	2
Choline	mg/kg	1890
Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.1
C18:1n-7 Oleic	%	1.0
C18:2n-6 Linoleic	%	1.9
C18:3n-3 Linolenic	%	0.2
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.2
Total Polyunsaturated	%	2.1
Other		
Cholesterol	mg/kg	50

^a Ether extract is used to measure fat in pelleted diets, while an acid hydrolysis method is required to recover fat in extruded diets. Compared to ether extract, the fat value for acid hydrolysis will be approximately 1% point higher.

^b Carbohydrate (available) is calculated by subtracting neutral detergent fiber from total carbohydrates.

^c Neutral detergent fiber is an estimate of insoluble fiber, including cellulose, hemicellulose, and lignin. Crude fiber methodology underestimates total fiber.

^d Energy density is a calculated estimate of metabolizable energy based on the Atwater factors assigning 4 kcal/g to protein, 9 kcal/g to fat, and 4 kcal/g to available carbohydrate.

^e Indicates added amount but does not account for contribution from other ingredients.

^f 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

^g 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

For nutrients not listed, insufficient data is available to quantify.

Nutrient data represent the best information available, calculated from published values and direct analytical testing of raw materials and finished product. Nutrient values may vary due to the natural variations in the ingredients, analysis, and effects of processing.

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc. © 2008 Harlan Laboratories, Inc.

harlanTM
Helping you do research better



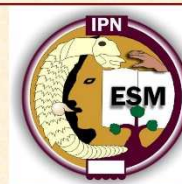
Teklad Diets, Madison WI | www.harlan.com | tekinfo@harlan.com | (800) 483-5523

RMS-0310-US-EN-01-DS-7017



Efecto del Ejercicio Aeróbico Moderado sobre la expresión de enzimas del ciclo de la Glutaminólisis en ratones *Balb c machos* de 6 y 12 meses de edad.

Sancillán-Martínez A, Reyna-García M, Cruz-Hernández T, Córdoba-González V, Estévez-García IQ, Campos-Rodríguez R, Lara Padilla E, Alarcón-Rojano E.
 Instituto Politécnico Nacional, Unidad de Investigación en Ciencias del Deporte, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.



ANTECEDENTES

El envejecimiento celular se ha asociado a la disminución de la fosforilación oxidativa llevada a cabo por las mitocondrias y al aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno. Resultan importantes las adaptaciones energéticas citosólicas y mitocondriales realizadas durante condiciones de estrés en las células. Los principales órganos encargados de las adaptaciones metabólicas para resistir el ejercicio moderado en la economía son el encéfalo, músculo esquelético, hígado y riñón (1). Paradójicamente, durante el envejecimiento la fosforilación oxidativa mitocondrial y la capacidad aeróbica disminuyen, de tal forma que estos eventos generan cambios morfofuncionales en las mitocondrias durante la longevidad. (2).

Desde hace algunas décadas, se ha propuesto que la glutamina participa en varias vías metabólicas y realiza funciones de señalización, siendo las mitocondrias el principal sitio del metabolismo de la glutamina (3). Recientemente se ha demostrado que la glutaminólisis tiene repercusiones en la estructura del organelo y la dinámica de ingreso y egreso mitocondrial de este amino ácido, sugiere un mutuo control entre la bioenergética mitocondrial y celular. Las enzimas involucradas en esta dinámica son: glutaminasa 1 (GLS1), glutamato deshidrogenasa (GLUD) y glutamato amonio ligasa (GLUL) (4).

Aún más reciente, se ha demostrado que el catabolismo mitocondrial de la glutamina participa en el balance celular redox lo que incluye apoptosis y proliferación celular.

OBJETIVO

Evaluar el efecto del ejercicio aeróbico moderado sobre la expresión de los genes involucrados en la glutaminólisis.

MATERIAL Y METODOS

Se formamos cuatro grupos de ratones BALB C machos, dos con dieta ad libitum (ADL) y con ADL + EAM (AEM). Cada grupo se subdividió a su vez, en otros dos grupos, uno con seguimiento durante 6 meses y el otro a 12 meses. Posteriormente se sacrificaron y se tomó biopsia de hígado y se guardó en TRIZOL hasta su análisis, se aisló RNA total la determinación de la expresión génica mediante PCR en tiempo real empleando sondas tipo Taqman, de los genes Glutamato Deshidrogenasa (*Glud*), *Gls* (Glutaminasa 1) y *Glul* (Glutamato sintetasa o amonio ligasa). Los resultados fueron analizados por T de student.

RESULTADOS

Grupos de ratones con dieta ad libitum (Figura 1: No encontramos diferencias significativas en la expresión del gen *Glud* entre los grupos de 6 y 12 meses de edad (A). A diferencia de la disminución significativa en *Gls* y *Glul* (B y C).

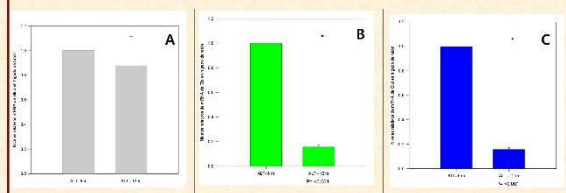


Figura 1: Niveles de expresión en hígado de los genes *Glud* (A), *Gls* (B) y *Glul* (C).

RESULTADOS

Grupos de ratones con EAM (Figura 2): Encontramos aumento estadísticamente significativo en la expresión del gen *Glud* en ratones de 12 meses comparados con 6 meses. En cuanto a la expresión del gen *Gls* encontramos disminución significativa en ratones de 12 meses comparados con los de 6 meses. Mientras que la expresión del gen *Glul* no tuvo variación estadísticamente significativa.

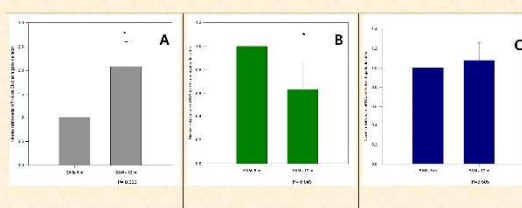
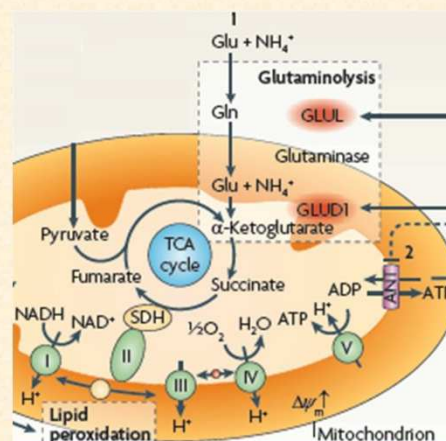


Figura 2: Niveles de expresión en hígado de los genes *Glud* (A), *Gls* (B) y *Glul* (C).

CONCLUSIONES

A diferencia del músculo esquelético que produce glutamina, y del intestino que la consume, se ha demostrado que el hígado produce y consume glutamina, de tal forma que al consumir glutamina favorece la producción de glutamato el cual, a su vez, participa como fuente de carbonos para el ciclo de Krebs y al mismo tiempo, amortigua el estado de acidosis provocado por el ejercicio, al aceptar protones.



BIBLIOGRAFIA

- 1) Ahmed A, White CM, Chang LY, Schneider BK, Allen CB. Glutamine protects mitochondrial structure and function in oxygen toxicity. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2001;280:L778-81.
- 2) Saunders LR, Verdin E. Stress response and aging. *Science* 2008;323:1021-2.
- 3) McGlavin JD, Bungard CI. The transport of glutamine in mammalian cells. *Frontiers in Bioscience* 2007;12:874-82.
- 4) Mateo JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Pathways from glutamine to apoptosis. *Frontiers in Bioscience* 2006;11:3164-80.

Anexo 3. Diploma del 2º Congreso Internacional en Ciencias del Deporte 2013.



Anexo 4. Cartel presentado en el 2º Congreso Internacional en Ciencias del Deporte 2013.

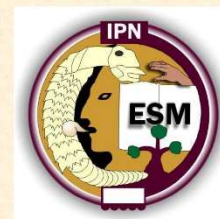


METABOLISMO DE LA GLUTAMINA EN EL MÚSCULO ESTRIADO DE RATONES DE 12 MESE DURANTE EJERCICIO AERÓBICO MODERADO Y EXTENUANTE

Santillán-Martínez Alicia; Reyna-Garías Humberto; Cruz-Hernández Teresita Rocío; Lara-Padilla Eleazar; Campos-Rodríguez Rafael; Abarca-Rojano Edgar

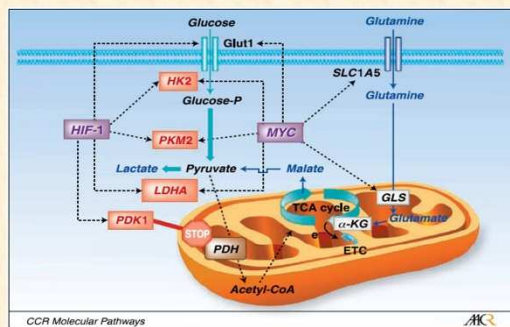
medik_2004@yahoo.com.mx

LABORATORIO DE RESPIRACIÓN CELULAR, LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE, SEVILLA ESPAÑA.



Introducción

La adaptación metabólica durante el ejercicio en el músculo esquelético, tiene como prioridad el soporte bioenergético. Durante un ejercicio de velocidad y fuerza (menos de 10 segundos), el aporte energético proviene por completo del fosfato de creatina y del poco ATP del músculo. A su vez, durante un ejercicio máximo (minutos de duración), el aporte energético proviene principalmente de la glucólisis anaeróbica. Otro tipo de ejercicio, en el cual aumenta la duración del tiempo (más de 30 min), el aporte energético es obtenido de la glucólisis anaeróbica y aeróbica y menos del ciclo de Krebs. Un cuarto tipo de ejercicio máximo (2 a 3 hrs), dependen solo de la vía aeróbica, glucólisis aeróbica y fosforilación oxidativa.



Objetivo

Evaluar la expresión (mRNA) de los genes c-Myc, glutaminasa 1, glutamato deshidrogenasa (GLS GLUD respectivamente) y GLUL, en ratones bajo ejercicio moderado (acondicionamiento físico) y ejercicio extenuante (con y sin acondicionamiento).

Métodos

Se usó una población de 20 ratones machos de la cepa Balb/c de 12 meses de edad, alimentados con dieta NIH-31, divididos en 4 grupos (n=5). Los grupos fueron: 1) ALT (testigo, con dieta ad libitum, sedentario), 2) ALN (con dieta ad libitum, sedentario con nado de 5.5 hrs previo sacrificio) y dos grupos con acondicionamiento físico: 3) EAM (con dieta ad libitum y acondicionamiento para nado -ejercicio aeróbico moderado-) y 4) EAMN (con dieta ad libitum, acondicionamiento para nado y nado de 5.5 hrs previo sacrificio, -ejercicio extenuante-). Posterior al sacrificio, se extrajo una porción de músculo de la región anterior del muslo, se colocó en tubos de plástico tipo Eppendorf y se congeló a -70°C de temperatura, para el aislamiento del RNA utilizamos el kit Tri-reagent, el PCR-TR se realizó en el termociclador LightCycler 2.0 con sondas Taqman, la expresión génica se calculó con el software del equipo y por el método del $\Delta\Delta CT$. El análisis estadístico de las expresiones génicas se realizó con el software Sigma-Plot 12.

Resultados

A los 12 meses de experimentación, en cuanto a la expresión de c-Myc, encontramos aumento significativo en los grupos ALN y EAM vs. ALT. A su vez hay, disminución en la expresión en el grupo EAMN vs. EAM. En cuanto a la expresión de GLS1, encontramos aumento significativo en los niveles de expresión entre los grupos ALN, EAM, y EAMN vs. ALT. Además, hay diferencias significativas entre los grupos ALT y EAM, así como entre EAM y EAMN. (Fig. 1)

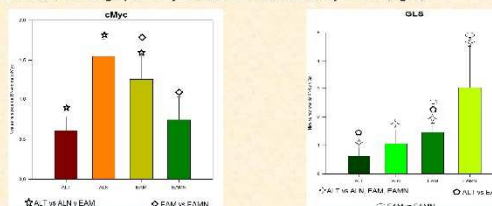


Fig. 1. Gráficas de expresión relativa de los c-Myc y GLS, muestran los resultados significativos obtenidos

En cuanto a la expresión de GLUD, encontramos aumento significativo en los niveles de expresión en el grupo EAMN, a su vez, entre los grupos ALN y EAMN así como en los grupos ALT y EAMN. En cuanto a la expresión de GLUL, encontramos aumento significativo en los niveles de expresión en el grupo ALT vs. ALN y EAMN, a su vez, entre los grupos ALN y EAMN. (Fig. 2)

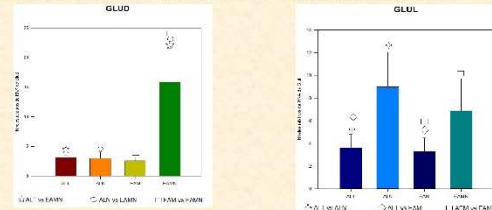


Fig. 2. Gráficas de expresión relativa de los GLUD y GLUL, muestran los resultados significativos obtenidos

Discusión-Conclusión

Nuestros resultados sugieren que los niveles del mRNA del gen c-Myc aumentan durante el ejercicio extenuante en animales sedentarios, contrario a los animales acondicionados bajo ejercicio extenuante. En cuanto a los niveles de expresión del gen GLS1, durante el ejercicio extenuante aumentan así como durante el ejercicio de acondicionamiento. Los niveles de expresión de GLUD, solo aumentan durante el ejercicio con acondicionamiento y nado extenuante. Los niveles de expresión de GLUL, aumentan durante el ejercicio extenuante y el ejercicio con acondicionamiento y nado extenuante. Está plenamente establecido que durante el ejercicio acondicionado y bajo rendimiento, el nivel de requerimientos energéticos en la fibra muscular es paulatino, a diferencia del requerimiento energético durante un ejercicio agudo y prolongado, sea condicionado no. Por ello, en nuestro modelo, el ejercicio intenso (acondicionado o no), el estrés agudo al parecer, suprime expresión de los genes de esta vía.

Por ello, el estrés en nuestro modelo promueve a nivel génico, la anaplerosis del ciclo de Krebs mediado por c-Myc y glutaminólisis, (conversión de glutamina a alfa cetoglutarato mediante por GLS1 y GLUD respectivamente). Así como la síntesis de glutamina mediado por GLUL que cataliza la conversión de glutamato a glutamina.

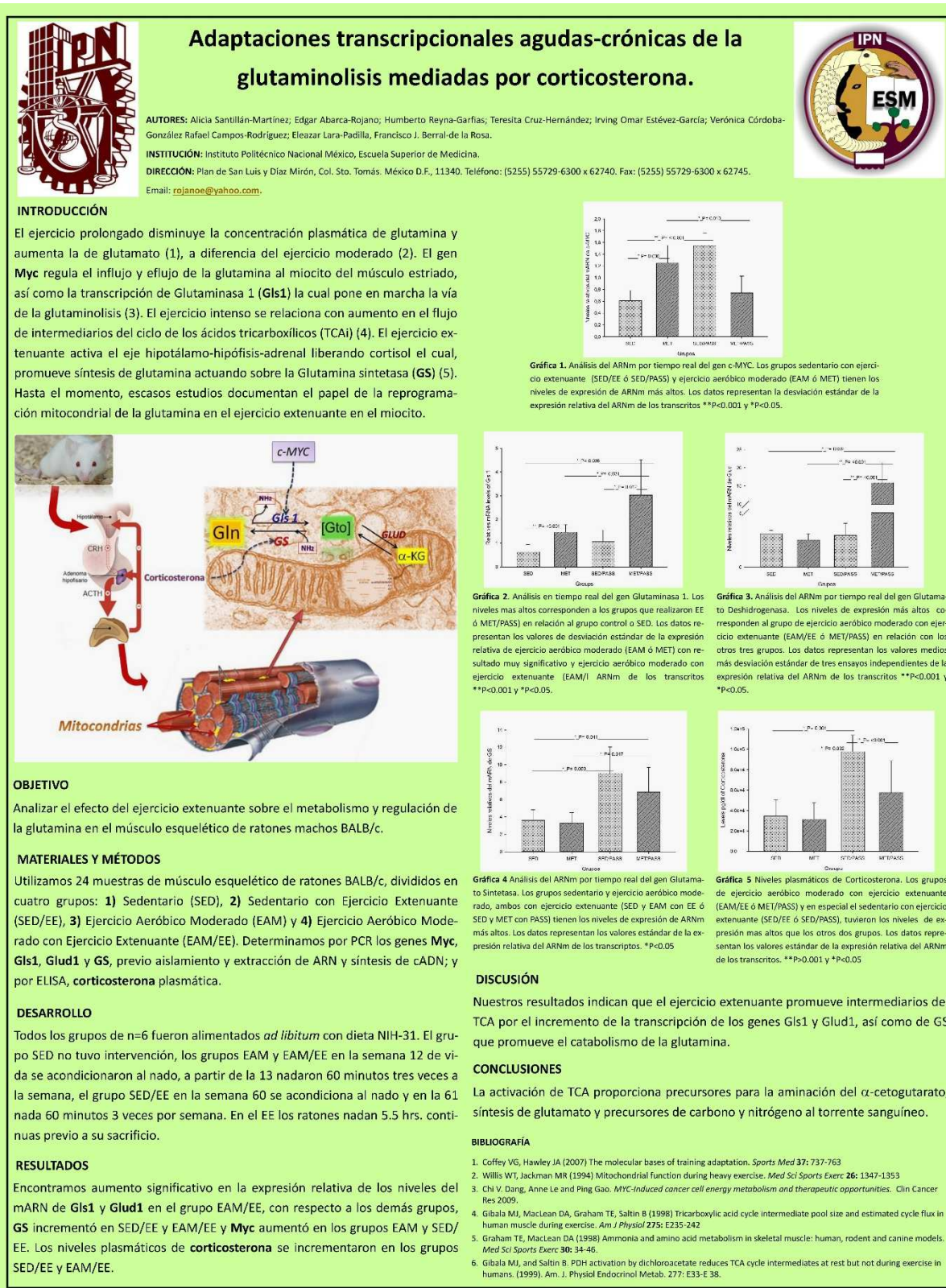
Bibliografía

Argenteiro P, 2002. Effect of physical activity on gene expression. *Cell and Tissue Research* 308: 13-24.
Baldi G, Pavesi B, Moriggi M, White R. Transcriptional response and metabolic demands of exercise in brown adipose tissue. *Am J Physiol* 2011; 301: R55-R64.
Krebs HA. Metabolism of amino acids. In: *Metabolism of amino acids and related compounds*. New York: Academic Press, 1969: 1-100.
Curi PP, Velloso JP. Metabolism of glutamine: energy and protein metabolism. *Ann Rev Physiol* 2011; 73: 1-10.
Witt W, Redman MW. Glutamine metabolism during exercise. *Cell Mol Life Sci* 2004; 251: 214-223.

Anexo 5. Diploma obtenido por la presentación del cartel en Mazatlán 2014.




Anexo 6. Cartel presentado en el VIII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica,
XIX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica,
XII Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular.



Anexo 7. Constancia de envío del Manuscrito a la revista BIOLOGY OF SPORT.

Paper Submission - Biology of Sport

Recibidos x

**Index Copernicus** <office@indexcopernicus.com>
para mí ▾

10 nov. (hace 3 días) ☆ ↶ ▾

🇺🇸 inglés ▾ > 🇪🇸 español ▾ Traducir mensaje

Desactivar para: inglés x

Dear ALICIA SANTILLAN ,

Thank for submission of your article:

Title: EFFECTS OF A FINAL BOUT OF STRENUOUS SWIMMING ON THE GENE PATTERNS INVOLVED IN GLUTAMINE METABOLISM.

Authors: Santillán-Martínez Alicia, Campos-Rodríguez Rafael, Abarca-Rojano Edgar, Reyna-Garfias Humberto , Drago-Serrano Elisa, Cruz-Hernández R Teresita, Berral-de la Rosa J Francisco, Lara-Padilla Eleazar

Please refer to your manuscript registration number (#25110) in all your official correspondence.

Should you like to check the status of your manuscript please visit the Biology of Sport website at www.biolsport.com
From the left-side menu select Authors Pathway, login, and then select option My articles. Click on selected title from the list of your submission to check the status of the manuscript, submitted files, messages

After positive evaluation of the manuscript the Authors will be requested to pay 150 Euro (or 600 Polish zloty or 200 US dollars) to the bank account of the publisher. Payment is intended to partially cover the cost associated with publishing.

Again, thank you for selecting Biology of Sport for publishing your work.

Sincerely,

Piotr Zmijewski
Editorial Office
Biology of Sport
www.biolsport.com

Anexo 8. Revista BIOLOGY OF SPORT, jcr.

Biology of Sport
pISSN 0860-021X eISSN 2083-1862

Home Editorial Board Editorial Staff Instructions for Authors

PubMed
National Library of Medicine NLM

Current issue
Volume 32, 2015 Number 4

Biology of Sport

Ahead of Print
Archival Issues
Archival Issues 1984-1998
Search
Newsletter
Manuscript Submission
Information for Authors
Journal's Reviewers
Special Information

Biology of Sport is the official journal of the Institute of Sport in Warsaw, Poland, published since 1984.

Biology of Sport is an international scientific peer-reviewed journal, published quarterly in both paper and electronic format. The journal publishes articles concerning basic and applied sciences in sport: sports and exercise physiology, sports immunology and medicine, sports genetics, training and testing, pharmacology, as well as in other biological aspects related to sport. Priority is given to inter-disciplinary papers.

Detailed information on preparation of the manuscript is described in the Instruction for Authors.

Biology of Sport is abstracted/indexed in:

Science Citation Index Expanded®
Focus On: Sports Science & Medicine®
ISI Journal Master List
[PubMed](#)
ISI Essential Science Indicators
SCOPUS
EBSCO SPORTDiscus
Directory of Open Access Journals (DOAJ)
CAB Abstract
INDEX COPERNICUS
Academic Journals Database
ProQuest (Physical Education Index)
NewJour
FreeMedicalJournals
OhioLink
INSEP

2014 Impact Factor: 0.789 [2015 Journal Citation Reports®]
2013 Index Copernicus: 13.74
2014 Ministry of Science and Higher Education in Poland: 15

EFFECTS OF A FINAL BOUT OF STRENUOUS SWIMMING ON THE GENE PATTERNS INVOLVED IN GLUTAMINE METABOLISM.

Abstract

Muscle tissue is the main site of synthesis for glutamine, the most abundant free amino acid in circulation. Glutaminolysis in muscle cells increases with the overexpression of the myelocytomatosis oncogene (Myc). Whereas intense exercise decreases plasma glutamine levels, moderate exercise training maintains normal levels, possibly by adaptive changes in various tissues including the liver, important in maintaining homeostasis. To evaluate the effects a long swim session (5.5 h) with and without previous moderate exercise training, on the glutamine metabolism skeletal muscle and liver. Male BALB/c mice were divided into four groups: sedentary (SED), sedentary with a final bout of strenuous swimming (SED/SSW), moderate exercise training (ME), and moderate exercise training with a final bout of strenuous swimming (ME/SSW). Plasmatic corticosterone levels were measured by ELISA. With real-time PCR, gene expression was determined for Myc, glutamine synthetase (Gs), glutaminase 1 (Gls), and glutamate dehydrogenase 1 (Glud-1) in skeletal muscle and liver tissue. When comparing SED/SSW and ME/SSW with their respective controls, a significant increase in corticosterone levels was associated with greater Gs mRNA expression, transcript expression also increased for Myc in the SED/SSW group and for Glis and Glud-1 in the ME/SSW group. Long-term moderate exercise training may adapt the organism to better respond to strenuous activity by: 1) promoting the expression of genes of enzymes that increase intermediates of the tricarboxylic acid cycle, 2) moderating levels of the corticosterone response, and 3) decreasing Myc gene expression in skeletal muscle.

Keywords: corticosterone, glutamine, glutamate, glutaminase, metabolism.